

1.KISALTMALAR

- **BMP** Bone Morphogenetic Protein.
- **BOS** Beyin Omurilik Sıvısı.
- **BT** Beyin Tomografisi.
- **DDSA** Dodecenyl Succinic Anhydride.
- **EGL** Eksternal Granüler Tabaka.
- **EN1** Engrailed 1 geni..
- **GDF** Growth Differentiation Factor.
- **GFAP** Glial Fibrillar Acidic Protein.
- **H&E** Hematoksilen-Eosin.
- **HPLC** High Performance Liquid Chromatography.
- **İGL** İnternal Granüler Tabaka.
- **MDA** Malondialdehit.
- **MNA** Methyl Nadic Anhydride.
- **MRG** Magnetik Rezonans Görüntüleme.
- **MSS** Merkezi Sinir Sistemi.
- **MZ** Medial Tabaka.
- **NO** Nitrik Oksit.
- **PSS** Periferik Sinir Sistemi.
- **SOD** Superoksit Dismutaz.
- **SVZ** Subventriküler Tabaka.
- **RGH** Radyal Glial Hücre.
- **TBA** Tiobarbiturik Asit.
- **TGF- β** Transforming Growth Factor Beta.
- **TUNEL** Terminal deoxynucleotidyl-transferase-mediated deoxyuridine triphosphate-biotin insitu nick-end labelling.
- **VZ** Ventriküler Tabaka.
- **Zic1** Zinc Finger Protein of Cerebellum geni.

2. BÖLÜM I

2.1.GİRİŞ

2.1.1. ARAŞTIRMANIN KONUSU, AMACI VE ÖNEMİ

Kortikal displazi, intrauterin süreçte proliferasyon (nöronal diferansiyasyon, nöro-glial etkileşim), nöronal göç ve maturasyon dönemleriyle uyumlu olarak değişen derecelerde gelişimsel hataların neden olduğu kortikal malformasyonlardır [14, 20, 149]. Cerebral olduğu kadar cerebellar kortekste fokal veya jeneralize malformasyonları açıklamak için kortikal displazi terimi kullanılır. Displaziler intrauterin evrelere göre anormal kök hücre gelişimi, göç hataları ve nöronal proliferasyona bağlı sekonder malformasyonlardır [14, 20, 149,153, 218].

Radyolojik ve patolojik incelemeler, diffüz cerebellar displazilerin aşırı derecede cerebral lezyonlara (konjenital musküler distrofi veya diffüz cerebral polimikrogyria) eşlik ettiğini, ancak normal olgularda da semptomsuz olarak gözlenebileceğini ortaya koymaktadır [14, 15, 153].

Cerebral malformasyonlar sınıflandırırken otörler büyük oranda cerebellumu ihmal etmişlerdir [14, 15, 20, 153]. Bunun nedeni, olasılıkla cerebral anomalilerin kognitif ve nörolojik sonuçları belirlemede daha önemli olduğunun düşünülmesidir [14, 15]. Cerebelluma olan bu ilgisizlik, cerebral anomalilerle kıyaslandığında cerebellar anomalileri daha az anlamamıza yol açmıştır. Cerebellumun kognitif ve motor fonksiyonlarının yanısıra öğrenme için de önemli olduğu her geçen gün ayrıntılı araştırmalarla açıklanmaktadır [14, 15, 20, 22, 153].

Carmustine, DNA ve RNA'yı alkileyen bir ajandır ve bu özelliği nedeniyle intrauterinal kortikal displazi yaptığı literatürde deneysel olarak tanımlanmıştır [22]. Bu etki hamilelik döneminde X ışınına maruz kalan fetüs üzerinde meydana gelebilecek etkiye benzer bir etki göstermektedir [14]. Carmustine ile yapılmış deneysel ve klinik vakalar üzerine çalışmaları destekleyen literatürler oldukça sınırlıdır [14, 20, 22].

Melatonin (*N-acetyl-5-methoxytryptamine*) ise Pineal Bez'in salgıladığı bir hormon olup, son yıllarda güçlü bir serbest radikal çöpçüsü ve antioksidan olarak oldukça ilgi çekmektedir [79, 172, 176, 180, 212]. Melatonin'in indirekt antioksidan olduğunun keşfi, bu maddenin hem deneysel hem de klinik uygulamalarda kullanılmasının uygun olup olmayacağı konusunu gündeme getirmiştir [79, 172, 180, 212].

Bu çalışmada, gebe sıçanlara gebeliğin 2.evresinde (E15.gün) Carmustine uygulamasına bağlı olarak cerebellum'da oluşan kortikal displazi'nin derecesi, atipik odakların varlığı, Melatonin'in nöroprotektif etkisiyle displazinin derecesini düşürüp düşürmediğini saptamak ve olası pozitif etkisiyle klinikte kullanılabilirliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

Tüm gruplardan elde edilen histolojik kesitlere rutin ışık ve elektron mikroskopik bulguların yanısıra ilk kez uygulanan immunohistokimyasal tekniklerle displaziden etkilenen antijen ve enzimler tanımlanıp, deney grupları arasında biyokimyasal MDA ve SOD parametreleri değerlendirilmiştir. Üzerinde sınırlı histopatolojik çalışma bulunan cerebellar kortikal displazi ile ilgili literatüre katkıda bulunmak temel hedeftir.

2.2. GENEL BİLGİLER

2.2.1 Kortikal Displazi Genel Bilgiler

Bugüne kadar MSS malformasyonlarının embriyogenezisi ve kliniğe yansımaları tam olarak anlaşılamamıştır. Kortikal displazi, intrauterin dönemde değişen derecelerde gelişimsel hataların neden olduğu kortikal malformasyonlardır. Cerebral displazi'ler epileptik odaklar olarak da kabul edilmektedir. Bu olgularda, istemsiz hareketlerin yanı sıra, zeka ve öğrenme ile ilgili nörolojik testlerde gelişme geriliğine sebep oldukları varsayılmaktadır [118].

Çocukluk çağı epilepsilerinin % 25'inin altında yatan faktör kortikal gelişimle ilgili malformasyonlardır. Bu nedenle gelişme geriliği veya epileptik olan her pediatrik hastada kortikal malformasyonun dışlanmaması gerekmektedir [14, 98, 118, 144].

Radiyal migrasyonun bir sebeple durmasıyla sinir hücrelerinin anormal yerleşimine heterotopi denmektedir [14, 98]. Heterotopiler: subependimal heterotopi, fokal subkortikal heterotopi ve band heterotopisi olarak sınıflandırılır [14]. Bu olgularda epileptiform aktivite de görülür [14, 98].

Radyolojik ve patolojik incelemeler, diffüz cerebellar displazilere cerebral lezyonların eşlik ettiğini, ancak kortikal displazi tanımlanmamış olgularda da rastlantısal olarak bunların gözlenebileceğini ortaya koymaktadır [14, 27, 54, 58 153].

Konu ile ilgili patolojik bulgular içeren yayınlar, fokal displazik lezyonlarla ilgili bilgiler içermesine karşılık cerebral anomalilere eşlik eden displazik lezyonlarla (örn. rombensefalosinapsis ve molar diş malformasyonları) ilgili bilgiler daha fazladır [14, 54, 153].

İzole fokal cerebellar kortikal displazik vakalarda ise histopatolojik bulgular içeren yeterli bilgi yoktur; ancak, radyolojik bulgular cerebellar kortekste fokal disorganizasyonları ve beyaz cevherin hacminde azalmayı göstermektedir [14]. Bu bulgular cerebral kortekste fokal kortikal displazi bulguları ile benzerdir [14, 100].

Cerebellar kortikal displazi'nin oluşması ve mekanizması da açık değildir. Öne sürülebilecek olasılıklar arasında Purkinje veya granüler hücrelerde göçün genetik veya çevresel faktörlerle bozulması ve/veya gelişmekte olan hücre ve aksonlara yol gösteren hücresel veya hücrelerarası sinyalin düzensiz olması sayılabilir. Benzer şekilde, subkortikal heterotopilerin altta yatan nedeninin Purkinje hücrelerinin yetersiz migrasyonu mu, granüler hücrelerin aşırı göçü mü veya apoptotik mekanizmalardaki bozulmadan mı kaynaklandığı açık değildir [14, 54, 100, 153].

2.2.1.1. Uluslararası Kortikal Displazi Sınıflandırılması

Kortikal displazi'nin sınıflandırılmasında sinir dokusu hücrelerinin proliferasyonu, migrasyonu ve organizasyonlarından kaynaklanan malformasyonlar temel alınarak dört ana grup ve alt gruplar altında değerlendirilmiştir [14].

1. Anormal nöronal ve glial proliferasyondan kaynaklanan malformasyonlar:

A. Jeneralize

1. Azalmış proliferasyon - mikrolizensefali
2. Artmış proliferasyon - bilinmemektedir
3. Anormal proliferasyon (anormal hücre tipi)- bilinmemektedir (olasılıkla yaşamla bağdaşmaz)

B. Fokal veya multifokal

1. Azalmış proliferasyon - bazı şizensefaliler
2. Artmış proliferasyon - bilinmemektedir
3. Anormal proliferasyon (anormal hücre tipi)
 - a. Neoplastik olmayan
 - i. Tuberöz skleroz, Tip 1 ve 2

- ii. Fokal transmantı displazisi
- iii. Hemimegalensefali
 - α) İzole
 - β) Nörokutanöz sendromlarda
 - i. Epidermal nevus sendromu
 - ii. İto hipomelanozu
 - iii. Nörofibromatozis Tip 1
- b. Neoplastik (Korteks bozukluklarıyla ilişkili)
 - i. DNET
 - ii. Ganglioglioma
 - iii. Gangliositom

2. Anormal nöronal migrasyondan kaynaklanan malformasyonlar:

C. Jeneralize

1. Klasik (Tip 1) lizensefali (agyria-pachygyria spektrum)
 - a. Kromozomal 17'ye bağlı
 - i. Miller-Dieker sendromu
 - ii. İzole lizensefali sekansı
 - b. X'e bağlı
 - i. X-e bağlı lizensefali
 - ii. Subkortikal bant heterotopileri
 - c. Diğer lokuslar
2. Kaldırım taşı (Tip 2) lizensefali
 - a. Fukuyama konjenital musküler distrofi
 - b. Walker-Warburg sendromu
 - c. Göz-kas-beyin sendromu
3. Lizensefali – diğer sınıflandırmalara sokulamayanlar
4. Heterotopi
 - a. Subependimal
 - i. X'e bağlı (bilateral periventriküler nodüler heterotopi)
 - ii. Sporadik
 - b. Subkortikal
 - c. Kortikal katlanmalar (Simetrik)
 - d. Marjinal glionöronal heterotopi

D. Fokal veya multifokal

1. Fokal agyria/pachygyria (parsiyel lizensefali)
 - a. Bilateral posterior pachygyria
 - b. Bilateral pariyetal pachygyria
2. Fokal veya multifokal heterotopi
 - a. Fokal subependimal nodüler
 - b. Fokal subkortikal nodüler
 - c. Fokal karma subkortikal subependimal
 - d. Kortikal katlanmalar (tek taraflı)
 - e. Marjinal glionöral heterotopi
 - i. Fetal alkol sendromu
 - ii. Diğerleri
3. Korteksin organizasyon anomalisi ile birlikte fokal veya multifokal heterotopi
 - a. Fokal subependimal nodüler
 - b. Fokal subkortikal nodüler
 - c. Fokal karma subkortikal subependimal

- i. Aicardi sendromu
 - ii. Peroksizmal bozukluklar
 - iii. Multipl acyl-CaA-dehidrojenaz eksikliği
- d. Kortikal katlanmalar (tek taraflı veya asimetik)
- e. Marjinal glionöral heterotopi
- 4. Aşırı miktarda tek ektopik beyaz cevher nöronu
- 3. Anormal kortikal organizasyondan kaynaklanan malformasyonlar:**
 - E. Jeneralize
 - 1. Polimikrogyria (PMG)
 - F. Fokal veya multifokal
 - 1. Polimikrogyria/şizensefali
 - a. Bilateral simetrik PMG
 - i. Bilateral anterior PMG
 - ii. Bilateral perisilvian PMG
 - iii. Bilateral posterior PMG
 - b. Asimetrik PMG
 - c. Şizensefali ve karma şizensefali PMG
 - 2. Fokal veya multifokal displaziler (balon hücreli)
 - 3. Mikrodisgenezis
- 4. Sınıflandırmaya sokulamayan kortikal gelişim malformasyonları**

2.2.1.2. Kortikal gelişim malformasyonlarıyla ilişkili sendromlar

- 1. Metabolik sendromlar
 - Zellweger sendromu
 - Neonatal adrenolökodistrofi
 - Peroksizomal bifonksiyonel enzim eksikliği
 - Rhizomelik kondodisplazia punktata
 - Glutarik asidüri II
 - Menke Kinky saç sendromu
 - GM₂ gangliosidozis
- 2. Nöromusküler sendromlar
 - Walker-Warburg sendromu
 - Fukuyama konjenital musküler distrofi
 - Kas-göz-beyin sendromu
 - Miyotonik distrofi
 - Ön boynuz artrojiropozis
- 3. Nörokutanöz sendromlar
 - İnkontinensia pigmenti
 - Tip I nörofibromatozis
 - İto hipomelanozu
 - Proteus sendromu
 - Ensefalokranial kütanöz lipomatozis
 - Tübero sklerozis
 - Epidermal nevüs sendromu
- 4. Multipl konjenital anomali sendromları
 - Smith-Lemli-Opitz sendromu
 - Potter sendromu
 - Cornelia de Lange sendromu
 - Meckel-Gruber sendromu

- Oro-fasiyal-dijital sendromu
- Coffin-Siris sendromu
- Bergeron sendromu
- Kısa-küçük sendromu
- 5. Kromozomal sendromlar
 - Trizomi 13
 - Trizomi 18
 - Trizomi 21
 - 4p depleasyonu
 - 17p13 depleasyonu (Miller-Dieker sendromu)
 - Xq22.3 depleasyonu (band heterotopisi)
 - Xq28 depleasyonu (X'e bağılı subependimal nodüler heterotopi)
- 6. İskelet displazileri
 - Tanatorik displazi
- 7. Diğer MSS displazileri
 - Aicardi sendromu
 - Joubert sendromu
 - Rombensefalosinapsis
 - İdiopatik lizensefali sekansı
 - Konjenital bilateral perislivian sendrom
- 8. İkiz sendromları
 - Parabiotik ikiz sendromu[14].

2.2.1.3 Cerebellar malformasyonların analizi ve sınıflandırılması

Cerebral hemisfer malformasyonlarına ilişkin bir çok sınıflandırma yapılmıştır, ancak cerebellar malformasyonlara ilişkin kabul görmüş bir sınıflama bulunmamaktadır. Dandy-Walker gibi bazı özel durumlara radyolojik yayınlarda sıklıkla rastlanmasına karşın Dandy-Walker malformasyonları ile diğer posterior fossa kistik malformasyonları arasındaki ilişkiye ait zıt görüşler bulunmaktadır. Dandy-Walker [35, 16, 171, 217] malformasyonları diğer cerebellar malformasyonlarla [188] birlikte de oluşabilmektedir. Orta ve arka beynin “molar diş” tipi malformasyonları olarak bilinen Joubert [14, 27, 100], Arima [11] ve Senior-Löken sendromları [126, 188, 193], rombensefalosinapsis gibi malformasyonlar fazlaca tanımlanmamıştır. Bunların diğer cerebellar

malformasyonlarla ilişkisi de açık değildir. Açıklanabilen cerebellar hemisferik [210] ve vermian malformasyonlarda [54, 87] tanımlanmasına karşın yeterince anlaşılamamıştır. Literatürde birkaç olgu sunumu dışında yeterli sayıda yayına da rastlanmamaktadır [14]. Bunun da ötesinde cerebellar malformasyonlu hastalarda prognoz da bilinmemektedir. Ayrıca, cerebellum ve beyin sapının içine yerleştiği posterior fossaya ait olabilecek belirti ve semptomları olan çocuklarda dikkati çeken cerebellum anomalisinin atrofi mi, hipoplazi mi, yoksa malformasyon mu olduğunu ayırtetmek de oldukça zordur [64, 170, 206].

Cerebellumda gözlemlenen kortikal displazik sendromlar; Dandy-Walker kompleksi, Cerebellar kortikal disgenezis, Cerebellar yapıların hipogenezisine eşlik eden anomaliler, Joubert sendromu ve rombensefalosinapsis olarak tanımlanmıştır. Bunlar;

2.2.1.3.1 Dandy-Walker Kompleksi

Klasik bilgilere göre posterior fossanın kistik malformasyonları Dandy-Walker malformasyonu, Dandy-Walker varyantı ve eşlik eden mega sisterna magna olarak sınıflandırılır.

Dandy-Walker malformasyonu; oldukça genişlemiş bir posterior fossa, tentorium cerebelli'nin yüksekte durması, vermis hipogenezisi veya agenezisi ve 4. ventrikülün posterior fossayı tamamen dolduracak şekilde kistik dilatasyonu ile karakterizedir [165, 215]. *Dandy-Walker varyantı* ise birçok farklı anlamı olan bir tanımlamadır. Bazıları bu terimi hipogenezise uğramış bir cerebellar vermis ve posterior fossa genişlemesi olmaksızın 4. ventrikülün kistik dilatasyonunu tanımlamak için kullanmaktadır. Bazıları ise 4. ventrikülün bir veya daha fazla

foramina aracılığıyla dışa akımının sağlandığı Dandy-Walker türünde malformasyonları tanımlamak için kullanılmaktadır [32].

4. ventrikülde BOS'un dışa akımını sağlayan bir foraminanın daha bulunmasının prognostik açıdan fazla önemi yoktur. Bu yüzden Dandy-Walker varyantı teriminin tamamen terkedilmesi, onun yerine ilk tanımdaki tablonun “cerebellar hipoplazi”, ikinci tanımdakinin ise Dandy-Walker kompleksinin bir parçası gibi kabul edilmesi daha doğru olacaktır. Eşlik eden sistemik anomaliler arasında polidaktili ve kardiyak anomalilere de rastlanılmaktadır [32].

2.2.1.3.2 Cerebellar Kortikal Disgenezis

Cerebellum anatomisinin MRG tekniğiyle görüntülenmesi cerebellar korteks ve folia anomalilerinin daha rahat tanınmasını sağlamıştır. Cerebellar korteksin disgenezisi genellikle cerebellar “Polimikrogyria” olarak bilinir. Gelişimsel malformasyonlar polimikrogyria veya “kaldırım taşı” lizensefalileri ile seyreder. Ancak, cerebellar korteksin bu tip malformasyonlarına fokal olarak da rastlanılabilmektedir [14].

2.2.1.3.3. Cerebellar Yapıların Hipogenezisine Eşlik Eden Anomaliler

Cerebellar yapıların hipoplazisine (hipogenezis) eşlik eden anomalilerin geleneksel sınıflandırılması; (a) total veya subtotal agenezis, (b) lateral aplazi, (c) median aplazi, (d) hipoplaziler (total, lateral ve medial) olmak üzere dört grupta yapılır [1, 148]. Bu sınıflama altta yatan embriyolojik veya patofizyolojik temeli

içermediği için radyologlar ve tedaviyi düzenleyecek olan klinisyen için yetersiz kalmaktadır.

Cerebellar hipoplaziler genellikle metabolizmayla ilişkili, konjenital enfeksiyonlar veya büyük çaplı kromozomal anomalilerden kaynaklanır. Cerebellar malformasyonlar ile klinik sendromlar arasında korelasyon zayıftır. Örneğin; tek taraflı cerebellar hipoplazisi olan hastalar cerebellar belirti ve bulgu vermeyebilir [27]. Ayrıca, cerebellar hipoplazi ile birlikte sekonder gelişen BOS birikimlerinin, etiyolojik nedeni farklı kist veya bası ile oluşmuş BOS birikimlerinden direkt görüntüleme yöntemleri ile ayırılması oldukça zordur [14, 27].

2.2.1.3.4 Joubert Sendromu

Joubert düzensiz solunum, anormal göz hareketleri, ataksi ve mental retardasyonu olan 5 çocukta karakteristik ortak bir patoloji olduğunu yayınlamıştır [100]. Joubert sendromlu hastalarda: a) cerebellar vermiste hipogenezis ve orta hattan yarıma b) cerebellar nukleuslarda displaziler ve heterotopi c) piramidal traktuslarda çaprazlaşmanın hemen hemen tamamen yokluğu ve d) oliva inferior, traktus trigeminus descendens, Nucleus solitorius, Nucleus gracilis ve Nucleus cuneatus'da yapısal anomaliler bulunmaktadır [100, 188].

Son yıllarda saptanan ek bulgular pedunculus cerebellaris superior ve ayrıca pons ile cerebrum arasındaki yolakların çaprazlaşmasının olmadığını göstermektedir. Bu bulgular ve Joubert sendromunda altta yatan gelişimsel anomalinin fossa posteriora komşu beyin sapı aksonlarının da orta hatta çaprazlanma yetersizliğinden kaynaklandığını düşündürmektedir [27, 239].

Joubert sendromlu hastalarda radyolojik bulgular tipiktir. Sagital görüntüler normal vermis katlanmalarının olmadığını göstermektedir. Vermis superior'un bir parçası bulunmaktadır, ancak orta hatta bir yarık vardır. Vermisin hipogenezisi; 4.ventrikülün ortasında üçgenimsi, üst tarafında ise yarasa kanadı benzeri görüntüye neden olur. Hipogenezise uğramış vermisin alt tarafında iki cerebellar hemisfer orta hatta birbirine bitişiktir. Pedunculus cerebellaris superior çaprazlama yapmaz, büyüktür ve neredeyse horizontal yerleşimlidir. Orta beyin ve cerebellum arasından uzandığı ve BOS ile çevrelendiği net bir şekilde görülür. Orta beyin, ön-arka çapta küçülmüştür. Bunun olası nedeni pedunculus cerebellaris superior ile çaprazlanmasının olmamasıdır. Orta beyin, çaprazlaşmamış ancak normalden büyük pedunculus cerebellaris superior ile karakteristik görüntüsü “molar diş belirtisi” olarak bilinmektedir. Bazı yayınlarda cerebral kortikal displazi ve gri cevher heterotopisi bulunabileceği bildirilmiştir [13, 14].

2.2.1.3.5 Rombensefalosinapsis

Cerebellar hemisferlerin birleşmesi ve cerebellar vermisin yokluğuyla karakterizedir. Klinik bulguları değişkendir ve eşlik eden supratentoriyal anomalilerin şiddetine bağlıdır.

Genel bulguları arasında Nucleus dentatus, pedunculus cerebellaris superior ve talamus füzyonu; buna bağlı olarak septum pellucidum'un yokluğu görülmektedir. Bunlara ilave olarak Nucleus oliva'da hipoplazi, limbik sistem anomalileri ve hidrosefali de sayılabilir. Klasik cerebellar deformitelerin yanında

supratentoriyal, infratentoriyal ve nörolojik olmayan başka anomaliler de bulunabilir [13, 14].

Radyolojik çalışmalarda cerebellar hemisferlerin dorsal kısımdan birleştiği, vermisin yok olduğu, pedunculus cerebellaris superior'ların birleştiği ve septum pellucidum'un olmadığı dikkati çeker. Genellikle, bu bulgulara ventrikülomegali de eşlik eder. Cerebellar anomaliyi BT ile saptamak zordur, ancak lateral ventrikülleri büyümüş görünen ve septum pellucidum'u olmayan bir hastada 4. ventrikülün arka taraftan noktalanması şeklindeki görüntü tanıya götürebilir. Tanı en kolay, MRG'de orta hatta araya giren vermis olmaksızın cerebellar folianın uzandığının görülmesiyle konur. Tanı bir kez konduğunda cerebellar korteks, ventriküller ve limbik sistem mutlaka dikkatle incelenmelidir. Eşlik eden anomaliler arasında kortikal malformasyonlar, hidrosefali ve çoklu sütür sinostozları sayılabilir [13, 14].

2.2.2. Sinir Dokusu Hakkında Genel Bilgiler

Sinir Sistemi vücudun en karmaşık yapısıdır, milyarlarca sinir hücresinden oluşup entegre bir ağ gibi vücut içine yayılırlar [102, 182, 204, 207].

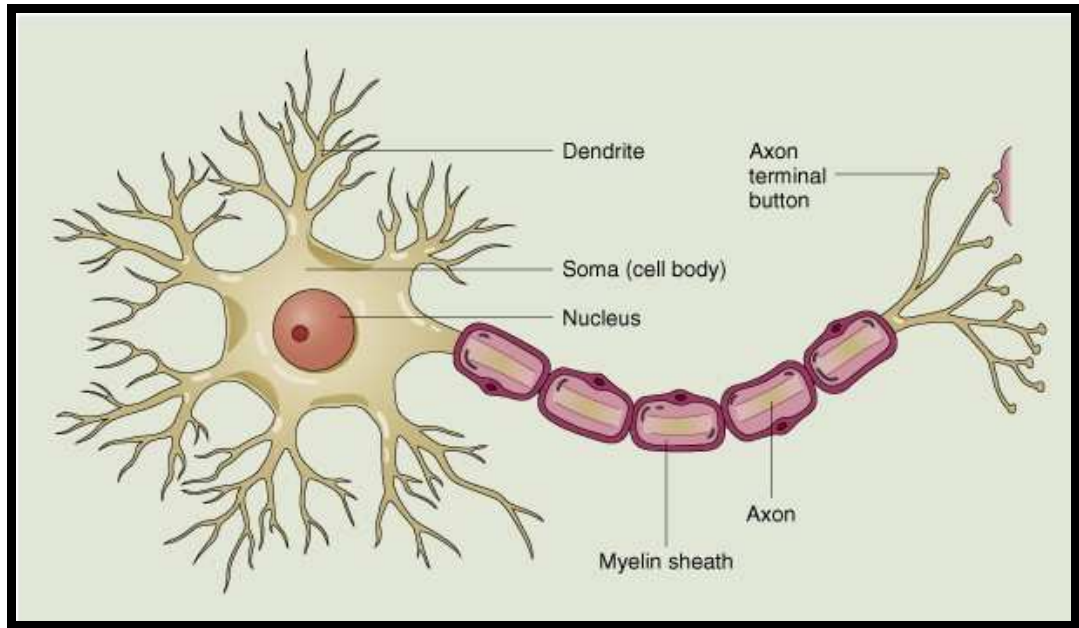
Anatomik olarak sinir sistemi; cerebrum, cerebellum, beyin sapı ve medulla spinalis'den oluşan Merkezi Sinir Sistemi (MSS) ile aksonlar ve perikaryon toplulukları olan gangliyonlardan oluşan Periferik Sinir Sistemi'ne (PSS) ayrılır [102, 103, 108, 182].

- **MSS;** cerebrum, cerebellum, mesencephalon, pons, bulbus ve medulla spinalis'den meydana gelir.
- **PSS;** kraniyal ve spinal sinirlerden meydana gelir.

Sinir dokusu hücreler ve hücreler arası maddeden oluşur. Hücreler nöronlar ve destek hücreleri (Nöroglia) olmak üzere 2 temel tiptir. Hücrelerarası ara maddede ise doku iskeleti olarak genellikle Tip III kollagen bulunur. Temel madde ise glikozaminoglikan ve proteoglikanlardan meydana gelir.

Nöron kimyasal stimulusların ve elektriksel impulsların kabulü ve sistemin diğer bölgelerine iletiminde görevlidir [38, 100, 108, 204].

Sinir sisteminin hücreleri vücudun diğer hücrelerine oranla daha fazla çeşitlilik gösterir. Ancak, bütün nöronlar kendilerini diğer dokulardaki hücrelerden ayıran ortak özelliklere de sahiptirler. Örneğin tipik olarak çok sayıda kutuplaşma gösterirler. Bu özellikleriyle mikrovillüslü epitel hücrelerine benzerler [103].



Şekil 1. Nöron yapısı [241].

Nöronlar ana hatlar olarak ortak bir plana sahip olsalar da 50'nin üzerinde birbirinden farklı tipte nöron alt grupları tanımlanmıştır. Bu gelişimsel kaynaklı hücresel farklılık moleküler düzeyde de kendini gösterir. Her nöron belirli makro

molekülleri (enzimler, yapısal proteinler, membran bileşenleri, salgı ürünleri) sentezler. Bu moleküllerin pek çoğu vücuttaki diğer hücrelerdekiyle aynı iken, bir kısım moleküller nöronlara spesifiktir.

Nöronların sınıflandırılması:

Nöronlar şekil ve büyüklüklerine göre üç önemli grupta incelenirler;

- **Duyu nöronları** reseptörlerden MSS'ye impulsu taşırlar [76, 102].
- **Motor nöronlar** MSS'den ya da gangliyondan efektör hücrelere impuls taşırlar [76, 102].
- **İnternöronlar** sinir hücreleri arasında ağ yapıyı tamamlayan farklı kısımları bağlarlar [76, 102, 108].

Nöronlar uzantılarının sayısına göre ise 4 grupta sınıflandırılır;

- **Apolar Nöronlar** primitif sinir hücreleridir ve sadece nöroepiteliyal hücrelerin bölünmesi sonucu ortaya çıkmaktadırlar. Başlangıçta, lümene doğru uzanan merkezi bir geçici dendrite sahipken manto tabakasına göç ettiklerinde bu çıkıntı kaybolur ve kısa bir süre için yuvarlak şekilli ve apolar bir hal alırlar [185, 108, 207].
- **Pseudounipolar nöronlar** tek uzantıya sahiptir. Dendritlerle alınan uyarılar perikaryona uğramadan doğrudan aksona iletilir [76, 102, 108].
- **Bipolar nöronlar** tek akson ve tek dendrite sahiptir [76, 102].
- **Multipolar nöronlar** bir akson ve iki veya daha fazla dendrit içerirler [102, 108, 182, 207].

2.2.2.1. Sinir Hücresi (Nöron) Bileşenleri

Nöronların ana fonksiyonel bölümleri olan hücre gövdesi (Perikaryon), dendrit, akson ve sinir sonlanmaları fonksiyonel polarizasyon ile ayrılırlar (**Şekil 1**). Pek çok nöronun RNA ve protein yapımında görev alan organelleri ve nükleusunu içeren hücre gövdesi total volümün 10'da 1'i kadardır. Hücre gövdesinden kökenlenen dendritler ve akson volümün geri kalan kısmını oluşturur. Dendritler diğer nöronlardan sinaptik verileri alabilmek için şekillenmiş ve defalarca dallanmış ince uzantılardır. Hücre gövdesinden çıkan aksonlar, elektriksel impulsları nöronun sinaptik sinir sonlanmalarından diğer nöronlara veya diğer hedef organlara iletilmesinde görev alırlar [76, 103, 108, 207].

2.2.2.1.1 Organeller

Nöron boyunca seçici olarak dağılım göstermektedir. Mitokondri, peroksizomlar, granüllü endoplazmik retikulum, granülsüz endoplazmik retikulum, golgi kompleksi, salgı vezikülleri, endozomlar, lizozomlar ve çok sayıda taşıyıcı vezikül gibi pek çok yapıyı içeren membranlı organeller birbirleriyle de yakın ilişki içindedirler [76, 102, 108, 207].

Vakuolar cisim membranları, nöron dış membranının derin invaginasyona eşdeğer kabul edilmektedir. Lipid çift katmanının iç tabakası hücre zarının dış tabakasına denktir. Bu sistemin ana alt birimleri anatomik olarak devamsız olsa bile, membranlı ve lümen içi madde, bir bölümden bir bölüme transport vezikülleri aracılığı ile hızla ve serbestçe hareket eder. Örneğin; proteinler ve fosfolipitler granüllü endoplazmik retikulumda sentezlenir, golgi kompleksine taşınır ve salgı vezikülleri ekzositoz sırasında hücre membranı ile kaynaşır (salgı

yolu). Bunun tersine, hücre içi vezikül olarak hücre içine alınan membran hücre zarına vezikül geri dönüşümü veya geç endosoma yönlendirilmiş ve sonunda yıkım için lizozomlara yönlendirilir [76, 102, 108].

Granüllü Endoplazmik Retikulum'un özelleşmiş bir kısmı, nükleus yapısında bulunan kromozomal DNA ve ilgili proteinleri çevreleyen nüklear zarf adı verilen düzgün, küremsi yapıyı oluşturur. Bu sisterna, granüllü endoplazmik retikulum'un diğer bölmeleri ile devamlılık gösterir. İç ve dış nüklear membranlar füzyona uğrayarak nüklear porları meydana getirirler. Nüklear porlar nükleoplazma ile hücre sitoplazması arasında madde geçişi (RNA ve protein) sağlar. Bundan dolayı nükleoplazma ve sitoplazma fonksiyonel olarak sitosolün devamlılık gösteren birimleridir [100, 108].

Mitokondri ve peroksizomlar moleküler oksijeni kullanırlar. Mitokondriumlar, transfer edilebilen veya harcanabilen hücresel enerji ATP'yi üretir. Peroksizomlar peroksidasyon reaksiyonlarındaki detoksifikasyonda görev alır ve güçlü oksidant ajan olan hidrojen peroksidin birikimini önlerler [76, 102, 108].

2.2.2.1.2. Ara madde

2.2.2.1.2.1. Sitozol

Sitoplazmanın sıvı fazıdır. Bu fazda, sadece çoğunluğunu çeşitli metabolik reaksiyonları katalize eden enzimlerin oluşturduğu birkaç protein çözünmüş halde bulunur. Pek çok sitozolik protein bütün nöronlarda ortak olarak genel yönetici fonksiyonlarına sahiptir. Diğerleri değişik nöron tiplerinde spesifik rollere sahiptir. Örneğin; özel bir maddenin yıkım veya sentezinde görev alan enzimler nörotransmitter gibi davranırlar. Ayrıca, bazı sitozolik proteinler hücre içinde

düzensiz olarak dağılmışlardır. Bazı proteinler birbirleri ile ilişki kurarak kümeler, partiküller ve matriksi oluştururlar. Pek çok sitozolik proteinler, hücrenin periferinde hücre iskeleti matriksi içinde hücre membranına bitişik konsantre halde bulunur ve sinyal üretiminde görev alır [76, 102, 108].

Nöron hücresinin sınırları dış hücre membranı (plazmalemma) olarak tanımlanır. Biyolojik membranların genel asimetrik iki katmanlı yapısına sahiptir [102, 108].

2.2.2.1.2.2 Hücre İskeleti

Hücre iskeleti nöronun şeklini belirleyen ana yapı olup sitoplazmadaki organellerin dağılımından sorumludur. Üç ana yapıdan meydana gelir [3, 48, 102, 108];

- 1) Mikrotübüller (Nörotübüller)
- 2) Ara filamentler (Nörofilament, Nestin)
- 3) Mikrofilamentler (Aktin)

2.2.2.1.2.2.1 Mikrotübüller (Nörotübüller)

Nöronun perikaryon ve uzantılarında uzun hücre iskeletini oluştururlar. Ayrıca, gelişimsel olarak nöron uzantılarının oluşmasında ve devamlılığında rol oynarlar. Tek bir mikrotübül 0,1 mm'ye varan uzunluktadır. Mikrotübüller, tübüler düzende dizilmiş 13 protofilamentten yapılmıştır ve dış çapı 25-28 nm'dir. Her protofilament birkaç çift α ve β tübülün alt birimlerinin çizgisel olarak düzenlenmesinden oluşmuştur. Tübülünlerin α ve β altbirimleri en az 6 genden oluşmuş multigen ailesi tarafından kodlanır. Beyinde farklı genlerin ekspresyonu

kadar translasyonel modifikasyonlara bağlı olarak 20'nin üzerinde túbúlin izoformu bulunur.

2.2.2.1.2.2.2 Ara Filamentler

10 nm çaplıdır. Hücre iskeletinin çatısını oluştururlar. Aksonda en fazla bulunan fibriler bileşenlerdir. Sitokeratin olarak isimlendirilen protein ailesine ait olup diğer hücre ara filament tipleriyle ilişki içindedir. Vimentin, GFAP, desmin, keratin örnek olarak verilebilir. Ara proteinler N-terminal ve C-terminal kısmına sahip uzamış fibröz proteinlerdir. İki tane ara protein birbirlerine merkezi olarak sarılarak dimerize olurlar. Dimerler daha sonra paralel olmayan oryantasyon gösterir ve az zigzaglı bir şekil alarak tetramerleri oluştururlar. Tetramerler ise baş-kuyruk formu taşıyan protofilamentlerdir. Yaklaşık 8 protofilament bir araya gelerek ara filamenti oluşturur [48, 220].

Ara filamentler 6 değişik sınıfa ayrılır;

- 1.Asidik keratinler
- 2.Bazik keratinler
- 3.Desmin, GFAP, Periferin, Vimentin
- 4.Nörofilament triplet
- 5.Nüklear laminler
- 6.Nestin

Hücre şeklinin korunmasında ve organizasyonunda ara filamentler rol oynar. Buna göre ara filamentlerin tanımlanmasıyla hücre tipi bulunabilir. Örneğin;

GFAP astrositlere, nörofilamentler nöronlara, periferin periferik nöronlara, desmin kaslara, keratin ise epitele spesifiktir. Ara filamentlerin genetik kodlanması ve parça parça ekspresyon kontrolü ile hücre tipleri meydana gelir. Gelişim döneminde bir ara filament proteini bir başka ara filamente dönüşebilir. Nörolasyondan önce ektodermal hücreler sitokeratin içerir. Nöral tüp indüksiyonu sırasında nöroektoderm denen ektodermal tip hücreler Nestin ekspresyonuna başlar. Nestin multipotent nöronal kök hücreler ve onların soyundan gelen nöronlar ve glial hücreler tarafından eksprese edilir. Meydana gelen terminal farklılaşma sonucu nöronal hücrelerdeki Nestin, Alfa-interneksin, peripherin ve nörofilamentler bir arada bulunabilir. Glial hücrelerdeki vimentin ve eksprese edilen GFAP ile astrosit identifikasyonunda bir diğer ara filament değişme mekanizması ise gelişen iskelet kasında görülür. Erken embriyolojik dönemde Nestin somitin miyotom tabakasındaki presomatik mezodermden eksprese edilir [50, 140, 232].

2.2.2.1.2.2.2.1 Nörofilament

Nörofilament perikaryon ve hücre akson ve dendritlerinde sıklıkla saptanan nörona özgü bir ara filamentdir. Nörofilament 60 KD'luk NF-L, 100 KD'luk NF-M ve 115 KD'luk NF-L olarak isimlendirilen 3 alt birimden meydana gelen 10 nm çaplı hücre iskeleti elemanıdır. Ara filamentlerin ortak özelliği olan iki tane ara protein birbirlerine merkezi olarak sarılarak dimerize olurlar. Dimerler daha sonra paralel olmayan oryantasyon gösterir ve hafif zigzaglı bir şekil alarak tetramerleri meydana getirirler. Nöroplazma içerisinde hücre iskeleti elemanı olarak görev yaparken, yaralanma sonrası, akson rejenerasyonu, embriyonal

dönemde hücre göçü ve şekillenmede önemli fonksiyon görürler. İki alt grubu mevcuttur;

- Nestin
- Alfa-interneksin olarak sınıflandırılır.

2.2.2.1.2.2.2.2 Nestin

Nöronal kök hücreler kendilerini yenileme yeteneğinde olan multipotansiyel progenitör hücrelerdir. Tek bir nöronal kök hücre MSS'yi oluşturan nöronlar, astrositler, oligodendrositleri oluşturabilme kapasitesindedir [152]. Nestin MSS'de proliferen olan nöroepitelial multipotent prekürsör hücreler tarafından salgılanmaktadır. Nestin ince kıvrımlı fibriller olup dalgalı bir yapı gösterir. MSS formasyonu ise oldukça karışık bir süreçtir. Gastrula döneminde mezoderm, üstündeki ektodermi indükleyerek nöral plak şekline geçer, morfogenetik hareketler sonucu nöral plak yapısından nöral tüpe dönüşür. Boşlukta mitoz geçirenler hariç MSS hücreleri birlikte gelişir. Bu hücrelerin çoğu pia'dan luminaya doğru yerleşimli olup kolumnar pseudostratifiye tabakada bulunurlar. Nöral tüp hücrelerinin neredeyse tamamı Nestin pozitifdir, ancak immatür nöronlarda periferik bölgelerde etkisi azalır [50, 140, 232]. Kemirgenlerde, Nestin ilk olarak E7,75. günde proliferen MSS'ye ait bölgelerde ekspresen olmaktadır. E10,5. günde Nestin, nöral tübün glial hücreleri dahil tüm hücrelerde ekspresen edilmektedir. E15,5. günden itibaren yeni doğanda cerebellum, VZ, SVZ'de ekspresyonu devam etmektedir [50, 132].

Sonuç olarak, Nestin geni MSS kök/progenitor hücrelerde, hem embriyoda hem de yetişkinde ekspresen edilmektedir [50, 132, 232].

2.2.2.1.2.2.3 Mikrofilamentler

3-5 nm çapında olup hücre iskeletini oluşturan üç ana tip fibrilin en incesidir. Kas hücrelerinin ince flamanları gibi çift sarmallı heliks yapıda her biri ATP veya ADP taşıyan aktin monomerlerinin kutuplaşmış polimerleridir. Aktin tüm hücrelerin ana bileşeni olup, doğada en sık bulunan hayvansal proteindir. Aktin'in çok sayıdaki yakın ilişkili moleküler formunun her biri farklı bir gen tarafından kodlanır ve tamamlanır [76, 103].

2.2.2.2.2. Sinir Hücresi (Nöron) Bölümleri

2.2.2.2.2.1. Hücre Gövdesi (Perikaryon)

Nöron hücre gövdesi protein salgılamayı sağlar. Hücrenin geniş bölümüdür. kromatik nükleus ve büyük nükleolusa sahiptir. Nissl cisimcikleri denen ve thionin boylarıyla metakromasi gösteren granüller içerir. Perikaryon birçok mitokondri, büyük perinüklear golgi cisimciği, lizozom, nörotübül nörofilament, vezikül ve inklüzyon cisimcikleri içerir. Nissl cisimciği ve serbest ribozomlar dendrite uzanır ama asla aksona uzanmaz. Bu da akson ve dendritlerin elektron mikroskobunda ayırımını sağlar [76, 102, 103].

2.2.2.2.2.2. Dendrit ve Akson yapısı

Sinir hücreleri, hücrenin reseptör alanını arttıran dendritlere sahiptir. Dendritlerin dallanması nöronun diğer nöronlardan büyük miktarda impuls almasını sağlar [103, 204].

Dendritlerde aksondaki gibi nörofilament ve nrotbller fazla sayıdadır. Dendritik sitoplazma perikaryondan farklı olarak golgi kompleksi taşımaz.

Dendritler yüzeylerinde çok sayıda küçük çıkıntılara sahiptir. Bu dendritik çıkıntılar sinaptik bağlantı bölgeleridir (Sinaptik buton) [76, 103, 204].

Nöron tipine göre değişen uzunluk ve çaptaki silindirik yapılara akson adı verilir. Aksonların perikaryondan çıkış yerine akson tepeciği (=akson hillocks) denir. Perikaryon ve dendritte bulunan granüllü endoplazmik retikulum ve ribozomlar aksonda bulunmaz. Akson tepeciğinde nörotübüller fasiküler yada elementler şeklindedir. Aksonun plazma membranına aksolemma denir [76, 204].

Dendritlerin aksine, aksonlar sabit çapa sahiptirler ve fazla dallanmazlar. Aksoplazma birkaç mitokondri, nörotübül, nörofilament ve aksoplazmik retikulum sisternaları içerir. Poliribozomların ve granüllü endoplazmik retikulum'un olmayışı aksonların perikaryona ihtiyaçları için bağlı olduğunu göstermektedir [102, 108].

2.2.2.2. Nöroglia

Sinir dokusu hücrelerini desteklemekte görevlidirler. Memeli beyinde bu hücrelerin sayısı nöron sayısının 10 kat daha fazlasıdır [102, 204]. Kökenlerine ve işlevlerine göre sınıflandırılan çeşitli glia hücreleri vardır. Glia hücreleri temelde merkezi ve periferik glialar olarak sınıflandırılır [68, 102, 204].

- **Periferik glialar;** Schwann hücreleri, enterik glialar, manto hücreleri.
- **Merkezi glialar;** Oligodendrositler, astrositler, ependim hücreleri, mikroglialar.

2.2.2.2.1. Periferik Glialar

- **Schwann Hücreleri;** Oligodendrositler ile aynı işleve sahiptir, ancak PSS'deki aksonların etrafında bulunurlar. Bir Schwann hücresi periferik aksonun çevresinde myelin kılıfı oluştururken MSS'deki oligodendrositler birden fazla nöronun aksonu ve bunların kollateralleri etrafında kılıf oluştururlar [102].
- **Enterik glialar;** Gastrointestinal kanalın duvarında yerleşimlidir. İntramural ganglionların ve periferik sistemin elemanıdır. Enterik glialar beyindeki astrosit benzeri nöroglial hücrelerdir. Örneğin; ara filament proteinleri olan GFAP, vimentin ve kalsiyum taşıyan S-100 gibi molekülleri içerir. Beyindeki astrositlerle aynı görevleri yaparlar ve çevresindeki iyonik koşulların düzenlenmesi, büyüme faktörleri ve sitokinlerin salgılanması gibi birçok destekleyici rolleri bulunmaktadır [68].
- **Manto hücreleri;** Ganglion hücreleri etrafında bir kılıf oluşturan yassı hücrelerdir ve ganglion hücreleri için destek görevi yaparlar. Periferik nöroglia hücreleri ganglion hücreleri gibi krista nöralisten köken alırlar [102].

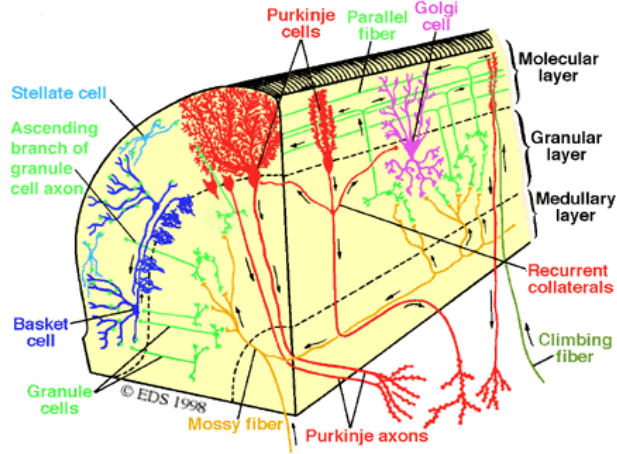
2.2.2.2.2. Merkezi Glialar

- **Oligodendrositler;** MSS'deki nöronların elektriksel uyarılarının dağılmamasını sağlayan miyelin kılıfı yaparlar [102, 108].
- **Astrositler;** Çok sayıda uzantılarından dolayı yıldız şeklinde gözlenirler. Bu hücreler yapılarını güçlendirecek GFAP içeren ara filamanlara sahiptirler. Astrositler, nöronların kapillerlere ve pia mater'e bağlanmasını

sağlar. Az sayıda uzun çıkıntılı astrositler fibröz astrositlerdir ve beyaz madde içinde bulunurlar. Elektron mikroskobunda mikrofilament demetlerinden oluşan yapılarının belirginliği ile tanımlanırlar. Çok sayıda kısa dallar veren uzantılara sahip olanlara protoplazmik astrositler denir ve gri madde içinde yer alırlar. Elektron mikroskobunda açık renkte nükleusları ve geniş sitoplazmik yapıda olmaları ile tanımlanırlar. Yapısal işlevlerine ek olarak nöronların iyonik ve kimyasal ortamını kontrol eder, kan-beyin bariyerini oluştururlar. MSS yaralanmalarında proliferatif olarak hücreler skar dokusu oluşturur [102, 108, 214].

- **Ependim Hücreleri;** Beyin ve omurilikte bulunan boşlukları, epiteliyal tarzda döşeyen nöroglialardır. Diğer nöroglia hücreleri ise doğrudan nöronlar arasında bulunmaktadır. Beyinde lateral ile 3. ve 4. ventriküllerde, medulla spinaliste canalis centralisi döşeyen ependim hücreleri oval nükleuslu, prizmatik yada genellikle izoprizmatik şekilli hücrelerdir. Embriyonal dönemde apikal yüzlerinde silyalar vardır, erişkinde bu silyalar çoğunlukla kaybolur. Desteklik ve BOS salgılama ile görevlidirler. Ependim hücreleri arasında zonula okludens, zonula adherens ve gap- junctionlar vardır. Tanisit olarak adlandırılan tiplerinde bazaldan uzanan uzantılar bulunur [108].
- **Mikroglia;** Kısa uzantılara sahip, uzamış, küçük hücrelerdir. H&E ile boyandığında küre şeklinde çekirdekli gliaların aksine koyu boyanırlar ve uzun şekilli çekirdekleriyle diğer glia hücrelerinden ayrılırlar. Bu hücreler sinir dokusunda mononükleer fagositik sistem aracılığı ile gelen fagositik hücrelerdir ve kemik iliğindeki öncül hücrelerden köken alırlar [76, 102, 108, 204].

2.2.3. Cerebellum Histolojik Yapısı ve Fonksiyonları



Şekil 2. Cerebellar tabakalar ve hücrelerin birbiriyle olan ilişkileri [242].

2.2.3.1. Yetişkin Cerebellum Histolojisi

Cerebellum'un iç yapısı, substantia grisea (gri cevher) ve substantia alba (beyaz cevher)'dan oluşur. Substantia grisea esas olarak cerebellum'un dış yüzünü örter ve korteksi oluşturur. Cerebellum'un içinde küçük intracerebellar nükleuslar bulunur (Şekil 2) [29, 102, 103, 108, 154].

2.2.3.1.1. Substantia grisea (Gri cevher)

Cerebellar korteks, cerebellar folialar içine uzanan paralel birçok transvers yarıklar ile katlara ayrılır. Her bir folium yüzeysel olarak gri cevher ile örtülmüş beyaz cevher içerir [103, 108, 154].

2.2.3.1.1.1. Korteks

Cerebellar korteks tüm uzunluğunca uniform bir yapıya sahiptir. Korteks 3 tabakaya ayrılır [102, 108, 204]:

- 1) Stratum moleculare (Moleküler dış tabaka)
- 2) Stratum gangliosum (Purkinje hücreleri içeren orta tabaka)
- 3) Stratum granulosum (Granüler iç tabaka)

2.2.3.1.1.1.1 Stratum moleculare

Moleküler tabaka iki tip nöron içerir: Dışta stellat hücreler (Neurocyti stellati) ve içte sepet (Neurocyti corbiferi) hücreleri yer alır. Bu nöronlar, dendritik arborizasyonlar ve folia'ların uzun eksenlerine paralel seyreden çok sayıda ince aksonlar arasına dağılmışlardır. Sepet hücreleri ovoid tarzda nükleuslar sahiptir. Dallanmış dendritleri ve substantia grisea yüzeyine paralel olarak uzanan aksonları aynı katman içerisinde ve yakın uzaklıktaki komşu bölgede sonlanırlar. Sepet hücrelerinin aksonları stratum gangliosuma kadar uzanır, gerek Purkinje hücre perikaryonu gerekse akson tepeciğinde sonlanır. Stratum moleculare'de diğer katmanlardaki nöronlardan gelen aksonlar veya tırmanıcı lifler aksonlarda sonlanırlar. Glia hücrelerinden astrositler ise özellikle piamater komşuluğundaki sınırdaki bariyer oluştururlar [102, 103, 204].

2.2.3.1.1.1.2 Stratum gangliosum

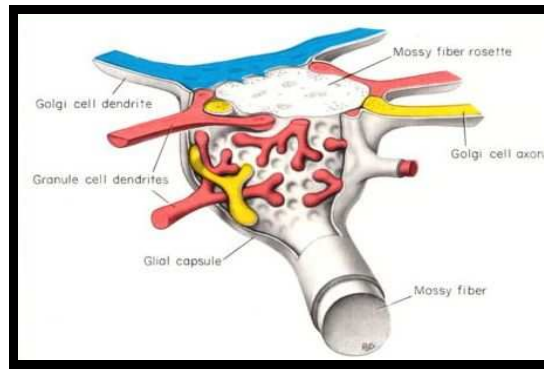
Gangliosum tabakasında Purkinje hücre perikaryonu, akson ve dendrit başlangıçları bulunabilir. Moleküler tabakaya kadar çıkan granüler tabakadaki nöronların aksonları, moleküler tabakaya uzanan afferentler, sepet hücreleri uzantıları bu katmanda gözlemlenebilir. Purkinje hücreleri büyük golgi tip I nöronlardır. Matara yada armutsu şekilde olup tek bir tabakada düzenlenme gösterir. Folium'a transvers düzlemde bu hücrelerin dendritlerinin moleküler tabakaya geçtiği görünür ve burada bol miktarda dallanmaya uğrarlar. Primer ve sekonder dalları düzdür sonraki dalları ise kısa ve kalın dendritik dikensi uzantılar tarafından örtülür. Dikensi uzantılar, granüler hücre aksonlarından gelen paralel lifler ile sinaps yaparlar [76, 102, 103, 108].

Purkinje hücresinin tabanından akson çıkar ve beyaz cevhere girmek için granüler tabakadan geçer. Akson beyaz cevhere girerken miyelin kılıfla sarılır ve intracerebellar nukleuslardan birisine ait hücrelerle sinaps yaparak sonlanır. Purkinje aksonunun kollateral dalları aynı bölgedeki yada uzaktaki bir foliadaki granüler tabakanın basket ve stellat hücrelerinin dendritleri ile sinaps yapar. Purkinje hücresinin aksonlarının çok azı beyin sapındaki vestibular çekirdeklerde sonlanmak üzere doğrudan beyin sapına geçerler [103, 204].

2.2.3.1.1.1.3 Stratum granulosum

Granüler tabakada küçük ve büyük granüler hücre perikaryonları bulunur. Küçük granüler hücrelerin aksonları stratum gangliosum tabakasından geçerek stratum moleculare tabakasına ulaşırlar, "T" şeklinde ikiye ayrılıp Purkinje ve

diğer nöronlarla sinaps yaparlar. Büyük granüler hücre aksonları ise Mossy fibrilleri ile sonlanırken dendritleri moleküler tabakada sonlanır. Stratum granulosum tabakasında küçük granüler hücre dendritleri, büyük granüler hücre aksonları ile komşu bölgede sonlanan Mossy fibrillerinden oluşmuş sinaptik bölgeye parankima adacıkları (Cerebellar Glomerül) denir (**Şekil 3**). Stratum granulosumda Purkinje aksonu efferent yolağı oluşturur. Mossy lifleri ve tırmanıcı lifler afferent yolağı oluşturur [29, 102, 108, 182, 204].



Şekil 3. Cerebellar Glomerul yapısı [243]

2.2.3.1.1.2. Intracerebellar nukleuslar (Nuclei cerebelli)

Orta hattın her iki tarafında dört tane gri cevher kitlesi cerebellum'un beyaz cevheri içine gömülüdür. Lateralinden mediale doğru çekirdekler; Nucleus dentatus, Nucleus emboliformis, Nucleus globus ve Nucleus fastigii'dir.

Cerebellar çekirdeklerin en büyüğü olan Nucleus dentatus her bir cerebellar hemisferin beyaz cevheri içinde yer alır. Medialinde bulunan açıklık ile buruşuk bir poşete benzer. İç kısmı pedunculus cerebellaris superior'un büyük kısmını oluşturmak için açıklıktan çekirdeği terk eden efferent liflerden yapılan beyaz cevher ile doludur.

Nucleus emboliformis oval biçimlidir ve Nucleus dentatus'un kısmen hilusunu örtecek şekilde medialinde yer alır.

Nucleus globosus, Nucleus emboliformis'in medialinde bulunan bir yada daha fazla yuvarlak hücre grubudur.

Nucleus fastigii, vermis cerebelli'de orta hatta yer alır ve 4. ventrikülün tavanına yakın yerleşimlidir. Nucleus globosus'dan daha büyüktür.

Intracerebellar nukleuslar basit dallanan, dendritleri olan multipolar nöronlardan ibarettirler.

Nucleus dentatus, Nucleus emboliformis ve Nucleus globosus'tan çıkan lifler cerebellumu pedunculus cerebellaris superior'dan, Nucleus fastigii'den çıkan lifler ise pedunculus cerebellaris inferior'dan geçerek terk eder [29, 102, 154].

2.2.3.1.2 Substantia alba (Beyaz cevher)

Vermis cerebelli'de az miktarda beyaz cevher vardır. Bu yapılanma bir ağaç dallarına ve gövdesine çok benzer ve "Arbor vitae" adını alır. Her bir cerebellar hemisferde büyük miktarda beyaz cevher vardır.

Beyaz cevher üç grup lifden yapılır:

(1) İntrinsik (2) Afferent (3) Efferent

İntrinsik lifler, cerebellum'un farklı bölgelerini bağlar ve organı terk etmez. Bazıları aynı tarafta vermis cerebelli ve cerebellar korteksin folia'larını bağlarken (assosiyasyon), bazıları iki cerebellar hemisferi (kommüssüral) birbirine bağlar.

Afferent lifler beyaz cevherin büyük kısmını oluştururlar ve cerebellar kortekse doğru giderler. Bu lifler, cerebelluma başlıca pedunculus cerebellaris medius ve inferior'dan girerler.

Efferent lifler cerebellum'dan çıkışı sağlar. Cerebellar kortekste Purkinje hücre aksonlarının büyük çoğunluğu cerebellar nukleuslara giderler ve buradaki nöronlarla sinaps yaparlar. Nöronların aksonları daha sonra cerebellumu terk ederler.

Lobus flocculonodularis ve vermis cerebelli'nin bazı kısımlarındaki çok az miktardaki Purkinje hücre aksonları ise cerebellar nukleusları atlayıp, sinaps yapmadan cerebellumu terk ederler. Bu nöronal hücreler dışında sustansia alba'da fibröz astrosit ve myelin yapımından sorumlu oligodendroglialar bulunmaktadır [29, 102, 108, 204].

2.2.4 Cerebellum Kortikal Mekanizmaları

Geniş fizyolojik ve sitolojik araştırmaların bir sonucu olarak, bazı temel mekanizmalar cerebellar kortekse bağlanmıştır. Tırmanıcı (climbing) ve Mossy (yosunsu) lifleri, korteks girişi için iki ana yol oluşturur ve Purkinje hücreleri için eksitatördür. Tırmanıcı liflerin herbiri tek bir Purkinje hücresinin dendritleri ile büyük miktarda sinaptik bağlantı kurarlar. Her bir tırmanıcı lifden az sayıda yandall ayrılır ve bu dallar yıldız (stellat) ve sepet (basket) hücreleriyle sinaps yaparlar. Diğer yandan Mossy fibrilleri, çok sayıda yaygın eksitatör etki yapar ve tek bir Mossy fibrili granüler hücreler aracılığı ile binlerce Purkinje hücrelerini uyarabilir. Purkinje hücreleri, aksonları aracılığı ile intracerebellar ve vestibular nukleuslarda inhibitör bir etki yapar. Cerebellar kortekste diğer hücreler olan

yıldız, sepet ve golgi hücreleri inhibitor internöronlar olarak fonksiyon gösterirler. Bu hücrelerin sadece uyarılan korteks alanı ile sınırlı kalmadığı, aynı zamanda tırmanıcı ve Mossy fibrilleri inputları tarafından oluşturulan Purkinje hücrelerinin uyarılma derecesini de etkilediğine inanılır. Buna göre düzensiz inhibitör impulslar, Purkinje hücreleri ile beyin sapı ve cerebral korteksin motor kontrol alanlarından kas aktivitesini değiştiren intracerebellar nukleuslara geçirilir [154, 204].

2.2.5 Cerebellum Fonksiyonel Anatomisi

Cerebellum'un filogenetik olarak en eski parçası Archicerebellum, vestibular sinirden ve vestibular nukleustan uyarıyı alır. Alt motor nöronlara uyarı, tractus vestibulospinalis, fasciculus longitudinalis medialis ve tractus reticulospinalis'le getirilir. Cerebellum'un bu parçası, iç kulaktan gelen vestibular uyarılara cevap verir ve kas tonusunda modifikasyona neden olup vücut dengesinin devamlılığını sağlar [29, 61, 143, 154, 204].

Paleocerebellum, dokunma ve basınç reseptörleri ile kas ve tendonlardaki proprioseptif sonlanmalardan uyarı alır. Alt motor nöronlara uyarı, özellikle gama efferentler ile tractus vestibulospinalis'le getirilir. Cerebellum'un bu parçası dokunma ve basınç bilgileri ile kas ve tendon gerilmelerindeki değişikliklere duyarlıdır. Buna kas gruplarının sinerjist hareketine yardım ederek ve kas tonusunu modifiye ederek cevap verir. Böylece istemli hareketlerin performansı ve postürün devamında aktif bir rol oynar [143, 154, 204].

Neocerebellum, karşı cerebral korteks'ten gelen tractus corticopontocerebellaris'den çok fazla uyarı alır. Aynı zamanda fibrae

olivocerebellaris'den de bilgi alır. Neocerebellum'dan çıkan uyarı, talamus'dan geçip korteks cerebri'nin motor alanlarına gelir ve daha sonra tractus corticospinalis ve fibrae corticonucleares ile de alt motor nöronlara gelir. Böylece neocerebellum düzgün, koordineli, istemli hareketi kolaylaştırır ve hareketin geniş, çok yönlü ve etkin olmasını sağlar [61, 143, 154].

2.2.6. Cerebellum Fizyolojisi

Cerebrumun motor merkezleri elektrik akımı ile uyarılırsa, bu merkezlerle ilgili kaslarda bir reaksiyon görülmektedir. Herhangi bir duyu merkezi uyarılırsa, bununla ilgili duyu algılanmaktadır. Fakat, cerebellum'un elektriksel uyarılması ise herhangi bir kas hareketi veya duyu meydana getirmemektedir. Bu sonuç cerebellumun hiçbir kasa direkt yolla uyarı vermediğini göstermektedir. Ancak, cerebellumun çıkarılması kas hareketlerinde ileri derece bozukluklara sebep olur. Cerebellum, cerebrum'un motor merkezlerinin yarattığı kas hareketlerini güçlendirir veya inhibe edebilir. Cerebellum cerebrumun diğer merkezlerinin kontrolörü ve koordinatörüdür ve beyin merkezleri ile vücut organları arasına yerleşmiş bir düzenleyici olarak iş görmektedir [70, 71].

Cerebellum, insanda cerebrum'un % 10 'u kadar bir kitleye sahip olmasına rağmen cerebrum yüzeyinden % 30 daha fazla yüzeye sahiptir. Pek çok kıvrımlar yaparak yüzeyini genişletmiştir [70, 71].

Cerebellum üzerinde ilk esaslı deneyler İtalyan fizyologu Luigi Luciani tarafından 20. yüzyılın başlarında yapılmıştır. Cerebellum fonksiyonu hakkındaki bilgilerin temeli Luciani tarafından atılmıştır. Bu araştırmacı, deney hayvanlarında yürüyüş ve vücut postürü, koordinasyon ve denge bozuklukları modelleri

oluşturmuştur. Luciani'den sonra hekimler 'sarhoş yürüyüşü'nü cerebellum fonksiyon bozukluğu için standart semptom olarak ele almışlardır.

Daha sonraki araştırmacılar, cerebellum ile sinir sisteminin diğer kısımları arasındaki bağlantıları bulmuştur. Bu verilere göre cerebellum ile cerebrum'un motor merkezleri arasında bağlantılar mevcuttur. Cerebellum, cerebrum motor merkezlerinden kaslara gidenler gibi impulslar almaktadır. Cerebellum bu iki yerden gelen impulsları karşılaştırır ve cerebrum motor merkezlerine, dolayısıyla indirek olarak kaslara, gereğine göre değiştirdiği impulsları gönderir [70]. Bu şekilde cerebellum, cerebral merkezlerinden verilen uyarıya karşı kasların gösterdiği reaksiyonun kontrol edilmesi ve emrin gereğine göre değiştirilmesi ile, kasların hareketlerini koordine etmekte, yumuşak ve ahenkli bir hale dönüştürmektedir.

Eğer hareketler birbirinin zıttı iki kas grubunun işe karışmasını gerektiriyorsa cerebellum her iki kas grubunun ayrı ayrı ne yapmaları gerektiğini cerebral merkezlerine bildirip ve fleksör kasların kasılmasını, ekstensör kasların gevşemelerini koordine etmektedir.

Cerebellum vücut dengesinin sağlanmasında benzer şekilde rol oynamaktadır. İlk impulslar iç kulaktaki semisirküler kanallardan gelmektedir. Cerebellum vestibular impulslar ile vücudun pozisyonunu korumaya çalışan kaslardan gelen proprioseptif impulsları birleştirir ve sonuç olarak gerek cerebrum gerekse medulla spinalis motor merkezlerine, beyin sapındaki merkezler aracılığı ile, impulslar göndererek ilgili kasların hareketlerini koordine etmektedir.

Purkinje hücreleri cerebellum'un esas ünitesidir. Afferent impulsların efferent impulslar haline çevrilmesi bu hücrelerde olmaktadır. Her bir Purkinje

hücresi impulsunu uzun bir akson ile cerebellumdan dışarı motor merkezlere göndermektedir [70, 71].

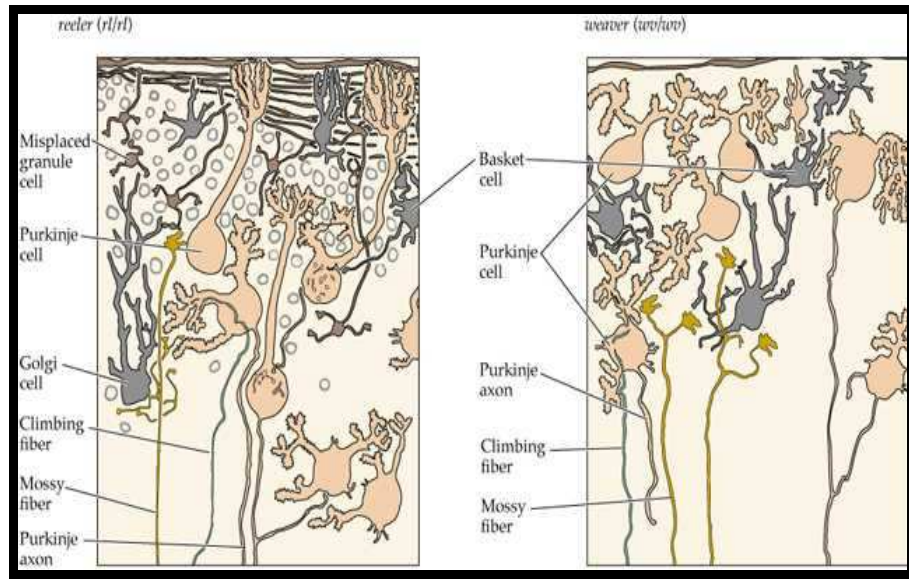
Bir granüler hücrenin aksonu moleküler tabakadaki sepet hücresi ile bağlantı kurar. Sepet hücresi 6 ila 12 Purkinje hücrelerini sepet gibi sarmıştır. Bir tek impuls ile gelen uyarı böylece cerebellumda yayılır. İmpuls önce bir çok granüler hücreyi etkiler; bunlardan her biri sepet hücreleri aracılığı ile yüzlerce Purkinje hücresine impulsu ulaştırır ve Purkinje hücrelerinden büyük bir impuls akımı çıkar. Böylece orijinal impuls birçok defalar artırılıp, beyin sapındaki merkezlere gönderilir [70]. Cerebellumdan cerebruma giden impulsların gönderilmesinden sonra bu merkezlerden tekrar cerebelluma impulslar gelmektedir. Cerebral kortekste olduğu gibi cerebellar kortekste de çeşitli fonksiyonların sınırlarının belirli bir şekilde lokalize olduğu görülmektedir. Cerebellar korteks'in elektriksel aktivitelerinin tayini ile lokalizasyon alanlarının haritasını çizmek mümkün olmuştur [70, 151].

Cerebellum ve bağlantıları, özetle sinir sisteminin sensorik ve motor yolları arasına yerleşmiş bir kontrol sistemidir [70, 151].

2.2.7.Yeni doğan (P0) Cerebellum Histolojisi

Yeni doğan cerebellum histolojisinde yetişkin afferent ve efferent aksonların yerleşimi belirgin olmasına karşın akson ve dendritlerdeki maturasyon, myelinizasyon ve sinaptogenezde belirgin gelişimsel dönem izleri bulunur. Bu yönüyle yetişkin cerebellum histolojisinden farklıdır. Dıştan içe korteks 3 katman oluşturur [4, 72, 95]:

- A) **Dış granüler tabaka (EGL);** Bu tabakada bulunan hücreler granüler hücreler, stellat ve sepet hücreleri perikaryonlarıdır.
- B) **Medial tabaka (MZ);** Purkinje hücre perikaryonlarını, granüler hücreleri, RGH (Bergman hücreleri) ve uzantılarını içerir.
- C) **İç granüler tabaka (İGL);** Büyük ve küçük granüler hücreler içerir.
- (Şekil.4)



Şekil 1.4 Yeni doğan cereballar histolojisi [244].

2.2.8. Cerebellumun Embriyolojik Gelişimi

Cerebellum gelişimi MSS'nin bir bölümü olarak nöral plak, nöral tüp ve beyin vezikülleri evrelerinden daha sonra makroskopik ve histogenezis boyutunda farklılaşmaya başlar.

Embriyonal dönemin 15. gününde ektodermal hücreler embriyonun yüzeyine doğru proliferer olur ve "ilkel çizgi-hat" (primitive streak) olarak tanımlanan bir doku plağı oluşturur. Bu ilkel çizginin bittiği yerde hızla proliferer

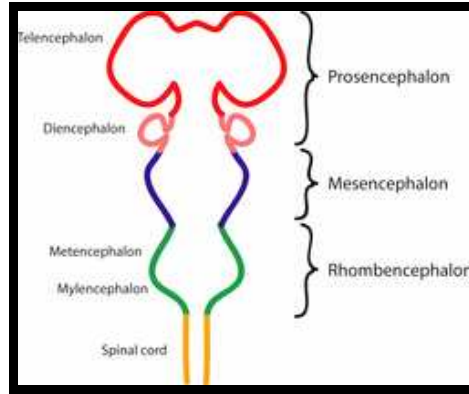
olan bir hücre grubu “Hensen düğümü” olarak tanımlanır ve sefalik ucu oluşturur. Daha sonra notokordu oluşturacak hücreler, Hensen düğümünden rostral tarafa doğru göç eder ve dorsal orta hat ektodermin nöroektoderm içine diferansiyasyonunu indükler. Nöroektodermin plak şeklinde belirlenmesi “nöral plak” olarak bilinmektedir [61, 95, 143].

17. gün civarında nöral plağın lateral kısımları kalınlaşmaya başlar. Bu kalınlaşmış katlar içinde yerleşmiş olan aktin kasılmaya başlar ve nöral kıvrımlar mediale doğru ilerler, iki uç orta hatta birbirine yaklaşır. 20. gün civarında nöral katlantılar, rombensefalon düzeyinde orta hatta birleşir. Nöral katlantıların bu birleşmesi ile “nöral tüp” oluşur [61, 95, 143, 185].

Nöral tüp kapanırken MSS’yi oluşturacak olan nöroektoderm üstte uzanan ektodermden ayrılır. Bu ektoderm ise deriyi oluşturacaktır [61, 95, 143].

Anterior nöroporun kapandığı dönemde nöral tübün rostral kavitesi içinde 3 keseleşme veya beyin vezikülü oluşur. Erken dönemde oluşan bu 3 alt bölünmeden; Prosensefalon (ön beyin), Mezensefalon (orta beyin) ve Rombensefalon (arka beyin) oluşmaktadır (**Şekil 5**). Rombensefalon, mezensefalondan sefalik fleksür aracılığıyla, servikal medulla spinalisten ise servikal fleksür aracılığıyla ayrılır. Prosensefalon daha sonra ikiye bölünür, bunlar Diensefalon (talamus, hipotalamus ve globus pallidum) ve Telensefalon (cerebral hemisferi, putamen ve Nucleus caudatus) olarak isimlendirilir. Diensefalonu oluşturan hücreler esas olarak daha sonraki 3.ventrikülün duvarındaki germinal matriksten kaynaklanırlar. Telensefalonu oluşturan hücreler ise daha sonraki lateral ventriküllerin duvarındaki hücrelerden kaynaklanmaktadır. Optik veziküller, anterior nöroporun kapanması sırasında prosensefalonun diensefalonun yan tarafından oluşmaya başlarlar. Telensefalonun gelişimi devam ederken

cerebral hemisferler posteriora doğru büyür, Mezensefalonu ve Rombensefalonun bazı bölümlerini kaplamaya başlar. Rombensefalon da ikiye bölünür; Myelensefalon (Pons ve Medulla oblongata) ve Metensefalon'u (cerebellar hemisfer ve vermis) oluşturur [95, 143, 185].



Şekil 5. MSS'nin gelişim aşamalarında farklılaşması [245].

Cerebellum gelişimi 4. hafta sonunda rombensefalonun alar plağında çift taraflı kalınlaşmayla başlar. Bu yapı rombik dudakları oluşturur. Rombik dudaklarda primordial cerebellar hemisfer ve cerebral korteksin granüler hücre prekürsörü olan germinal zonlar bulunmaktadır. Metensefalik rombik dudaklar kalınlaşarak bir çift cerebellum plağı oluşturur. Büyüyen rombik dudağın kranial parçası orta çizgide karşı karşıya gelerek birleşir ve 4.ventrikülü örten tek bir taslak oluşturur. Bu taslak önceleri yalnızca 4.ventrikülle çıkıntı yapar, fakat dorsal çıkıntı yapmaz. Daha sonra gelişen cerebellum dorsal olarak çıkıntı yaparak rombensefalonun kranial sonunda gülle biçimli bir şişkinlik oluşturur [61, 185].

Cerebellumu meydana getiren nöron ve glialar cerebellar hemisferde kendilerine ait yere 2 yolakla göç ederler. Derin cerebellar nükleusları ve

cerebellar korteksin Purkinje tabakasını meydana getirecek olan nöronlar, 4. ventrikül duvarındaki germinal matriksten dışa radyal olarak göç ederler [39, 41,169]. Bu nöronların germinal matrikste oluşması 9-13. haftaya denk gelmektedir [169, 186]. Cerebellar korteksin granüler tabakasını oluşturan nöronlar ise aksine daha kompleks bir yol izlemektedir. 11-13. haftalarda rombik dudakların lateral kısmında bulunan germinal bir zondan cerebellumun yüzeyine doğru tanjansiyel olarak göç etmeye başlar ve EGL'yi oluştururlar [169, 196].

EGL'deki hücreler daha sonra oldukça yüksek bir hızda proliferer olur ve granüler hücrelere farklılaşır [124]. Cerebellum oldukça hızlı bir büyüme dönemine girmiştir. Bu dönem 13.haftada başlar ve postnatal 7. aya kadar sürer [4, 66].

EGL'deki hücrelerin proliferasyonu devam ederken 16. haftada kardeş hücrelerin içe doğru migrasyonu başlar. İçe hareket eden kardeş granüler hücreler Purkinje hücrelerini geçer ve korteksin İGL'sini oluşturur. EGL hayatın ilk birkaç ayında maksimum hücre sayısına sahiptir, daha sonra granüler hücreler içe doğru göç etmeye başlayınca kitlesi küçülür. Postnatal ilk yılın sonunda EGL tamamen yok olur ve cerebellar korteks 3 tabakalı erişkin görünümünü alır. Gelişmekte olan cerebellar meninkslerdeki mezenşimal hücreler de cerebellumun gelişmesine katkıda bulunur. Meninks hücreleri 6- hidroksidopaminle hasarlanırsa, vermisin katlanması ve laminasyonu bozulur. Bu bozulma olasılıkla cerebellar korteksin glial yapı iskeletinin disorganizasyonuna bağlıdır. Glial iskeletin bozulmasının nedeni ise glia limitans eksterna'daki ekstrasellüler matriksi stabilize eden meningial- glial etkileşimin kaybıdır [155, 169, 197].

Cerebellar korteksin afferent ve efferent bağlantılarını, derin cerebellar nükleuslarla sinaps yapan aksonlar ve üst, orta ve alt cerebellar pedunculuslar

aracılığıyla MSS'nin kalan bölgeleriyle iletişimde olan aksonlar oluşturur. Cerebellar korteksin bazı yapılarının migrasyonu bitmiş olsa bile kortikal afferent ve efferent beyaz cevher yolakları oluşmaya devam eder. Gelişimsel tehditlerin varlığına rağmen, bu beyaz cevher yolaklarının oluşması nedeniyle cerebellum büyük oranda normal görünümündedir. Korteks ve medulla hemen hemen normal cerebellumdakine benzer orantıya sahiptir. Gelişimsel tehdidin türü ne olursa olsun cerebellum sadece biraz küçük görünür.

Gelişmekte olan hemisferlerin birleştiği yerde cerebellar vermis oluşur. 9. haftada hemisferler orta hatta üst taraftan karşı karşıya gelince birleşme başlar ve hemisferler büyüdükçe aşağı doğru devam eder. Vermisin oluşumunun tamamlanması 15. haftanın sonuna denk gelir ve eğer cerebellar hemisferler oluşmadıysa vermis de oluşmaz [143].

Cerebellum vermis ve hemisferleri girintili çıkıntılı enine kıvrılmalarla gelişimini sürdürür. Büyük primer fissür derinleşir, hemisferleri ve vermisi bir kranial ve bir kaudal loba ayırır. Bu loblar daha sonra ilave enine fissürlerin gelişmesiyle pek çok lobüllere bölünür ve lobüllerin yüzeyi folia denilen yaprak benzeri enine sıkıca paketlenmiş yapılarla şekillenir. Bu fissürleşme ve foliaların oluşumu tüm embriyonal ve fetal hayat boyunca devam eder ve cerebellar korteks yüzeyinin geniş ölçüde artmasına neden olur [143].

2.2.9 Cerebellar Korteksin Histogenezisi, Kortikal Laminasyon Modeli

Cerebellumun gelişiminde derin nukleuslar ve onları çevreleyen korteks ilk olarak oluşur [7]. Bunu Purkinje hücre prekürsörleri takip eder [6,7]. Purkinje hücrelerinin migrasyonu postmitotik prekürsörlerin manto tabakasından radyal

glial fibriller boyunca marjinal tabakaya doğrudur. Purkinje hücreleri erken postnatal periyoda kadar geniş bir tabakada yerleşirler. Kemirgen cerebellumunda, prekürsör hücreler E11-13.günde oluşur. Cerebellar korteksin temel efferent nöronu olan Purkinje hücresinin diferansiyasyonu cerebellar gelişimin erken döneminde gözlenir. Bu hücreler radyal glial sistem boyunca migrasyon ile rudimenter bölgeden germinatif zona ulaşır. Bunu diğer bir tabaka olan İGL'yi oluşturacak diğer hücreler izler [7, 104, 123, 196].

Nöral tüpte metensefalik rombik dudakların nöroepiteli, ventriküler manto ve marginal tabakaları yapmak için başlangıçta bir proliferasyona uğrar. Ancak, çoğalan ikinci bir hücre tabakası marginal bölgenin en üst tabakasında dikkati çeker. Çoğalan ventriküler tabakadan EGL ve İGL olarak adlandırılan yapılar gelişir [38, 61, 143, 185]. EGL, cerebellum korteksinin 3 kalıcı nöroblast popülasyonunu üretmek için birbirini izleyen proliferasyonlara uğrar. Bu nöroblast popülasyonları şunlardır; basket nöroblastlar, granüler nöroblastlar ve stellat nöroblastlar. Yetişkinde basket ve stellat hücreleri yüzeyde moleküler tabakayı oluşturur. Bunlar cerebellar korteksin daha geniş bir bölümüne yayılır [72, 111, 123, 143, 166, 209].

Yüzeyel EGL'nin klonal büyümesinden sonra, granüler hücreler ise farklılaşan Purkinje hücreleri tabakasını geçerek İGL yi oluşturmak üzere göç eder. Cerebellum'un efferent nöronu olan Purkinje hücresi böylece cerebellar kortekste merkezi organizasyonu sağlar.

Purkinje hücresi ve internöronlar, VZ'den dışa göç eder ve cerebellar nukleuslar üzerinde geniş bir bölgeye yerleşir ve granüler hücre prekürsör hücre popülasyonu ile sistemin çatısını yapar (**Şekil 6**). Evrimsel skalada cerebellar yapının 3 katmanının migrasyonu başlıca 2 tip nöron prekürsörün migrasyon

koordinasyonu ile oluşur. Bunlar EGL'nin granüler hücre prekürsörleri ve Purkinje hücre prekürsörlerinin radyal glial dağılımı olup her bir Purkinje hücresine 400 kadar granüler hücre eşlik eder [95].

Glial hücreler gelişen nöronlara nöronal göç sırasında yardımcı olacak şekilde organize olurlar. Kablo benzeri yapılar olan RGH migrasyonda kılavuzluk eder ve sonuçta İGL'deki nöronların sayısı artar (**Şekil 7**) [95]. Başlangıçta glial hücreler, nöral tüpün duvarında işlev görürler. Işınsal yerleşimli glial hücreler, çok yönlü göç için primer yolak sağlarlar. Hücre göçü dönemi sonrasında glial hücreler, yıldızlı astrositlere dönüşürler [189, 190]. RGH'ler ise ışınsal glial fenotip olup cerebellar korteksin Bergman glial hücresini oluşturur ki bunlar cerebellar korteksi radyal olarak düzene koyma işlevini üstlenirler. Bu glial hücreler, granüler hücrelerin göçünü desteklemek için, cerebellar sistemin çatısı üzerinde çoğaldıkları yerler olan germinal zondan derinlere doğru özelleşirler [143].

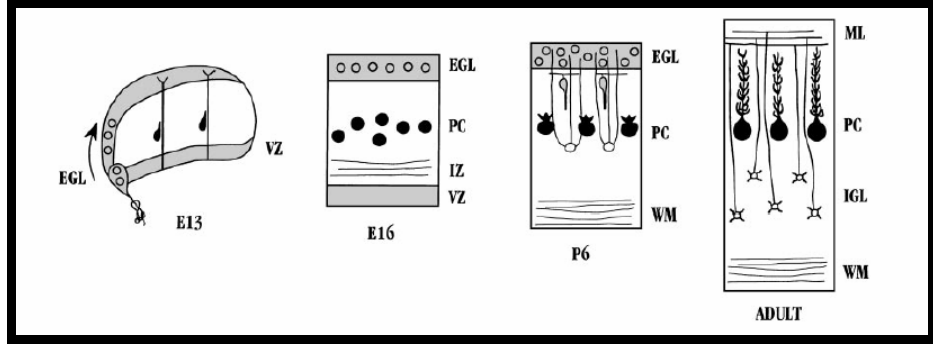
Pons ve bulbusun gelişimi direkt ve indirekt olarak periventriküler germinal tabakadan oluşur. Genelde erken dönemde beyin sapındaki motor ve duyu nükleusları göç eden hücrelerden oluşur [196].

Afferent nöronların sinaptogenezisleri için akson büyümeleri açısından ise Nuclei pontis ve olivae inferiorundan gelen afferent projeksiyonlar cerebellum'da artmaktadır. Gelişim sırasında Nuclei pontisten gelen Mossy fibrilleri, göç eden Purkinje hücre gövdesi ve sonra EGL'den İGL'ye göç eden granüler hücrelerle bağlantı kurar. Mossy fibrilleri Purkinje hücrelerini teğetsel geçer ve Mossy fibril terminalleri İGL'de olgunlaşır. Granüler tabakada granüler hücre dendrit veya aksonlarıyla sinaps yapar. Olivae inferiorundan tırmanan lifler Purkinje hücre gövdesi ile erken dönem sinaps yapar, daha sonra bunlar kaybolur. Ancak, Purkinje

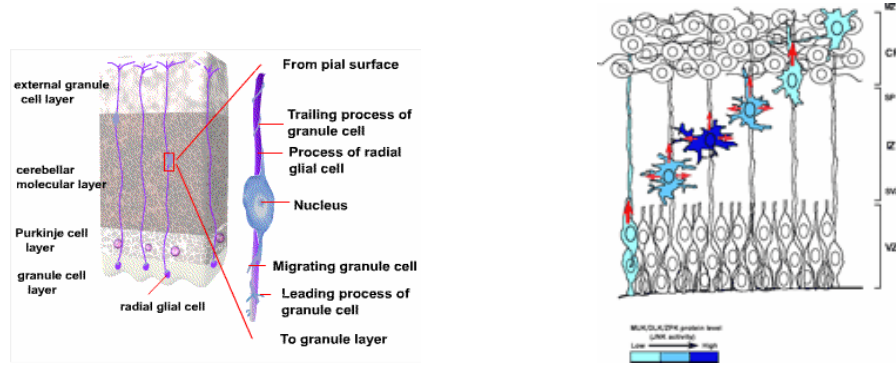
hücresinin dendritleriyle gelişen sinapslar kalıcıdır [231]. Purkinje hücrelerinin dendritik uzantıları direkt tırmanan liflerden ve indirekt olarak da Mossy fibrillerinden gelen afferent uçları almaktadır. Tırmanıcı lifler Nuc.oliva'nın nöronlarına aittir. Mossy fibrilleri cerebelluma giren diğer tüm liflerin terminal dallarıdır [84, 89, 142].

Cerebellar alanın nerede lokalize olacağının erken dönemde saptanması, homeotik genlerin temporal ve uzaysal ekspresyonuna bağlıdır. Orta beyin, ön ve arka beynin ilk şekillenmesinin kontrolünü, nöroepitelyum içindeki potent, embriyo kökenli bir organizatör yapı sağlamaktadır. Bu organizatör yapı, ortabeyin-arkabeyin sınırındaki istmik bir konstriksiyonu bölgesinde lokalizedir ve “m/h” veya “*istmik organizatör*” olarak isimlendirilmektedir [101, 233]. İstmik organizatörün varlığı genler ve sinyal molekülleriyle ilgili devam eden çalışmalarla kanıtlanmıştır. Örneğin; *En1* ve *En2* gibi kemirgen genlerinin embriyoda cerebellar yapının özelleşmesinde rol oynadığı bilinmektedir. Bu genlerin çıkarıldığı knockout farelerde cerebellar ve kolliküler anomaliler oluşmaktadır. Ayrıca, gelişmekte olan cerebrum'da aksonlara yönlendirici gibi çalışan bazı moleküllerin (örn. Netrinler ve bunların reseptörleri, *Wnt* sınıfında olan sinyal molekülleri) cerebellar granüler hücrelerin göçünü sınırlayarak cerebellum gelişmesinde rol oynamaktadır [51, 135, 138, 238].

Granül hücre canlılığı ve göçü çeşitli genler tarafından desteklenmektedir, bunlar arasında en önemlileri Pax6, Zic1 ve Math1'dir. Radyal gliaların korunması ise Pax3 gen ekspresyonu ile sağlanmaktadır [84, 142, 143, 196]. Purkinje hücrelerinin kimliği ve göçü Wnt3 de dahil birçok genin ekspresyonuna bağlıdır [187].



Şekil 6. Cerebellar hücrelerin embriyonik gelişimleri [95].



Şekil 7. Radyal glial sistemle göç eden nöronlar [246, 247]

2.2.10. İmmunohistokimyasal Markerların Kullanıldığı Molekül veya Yapılara Ait Antijen ve Enzim Dinamikleri

2.2.10.1. GFAP

GFAP, 52 KD boyutunda bir ara filamenttir ve glial hücrelerden astrosit ve ependimal hücrelerde görülür. Periferik sinir sisteminde ise GFAP Schwann hücreleri, enterik glialar ve duysal ganglionların satellit hücrelerinde gösterilmiştir. Neoplastik dokularda bu marker, astrositom ve ependimomların belirlenmesinde kullanılmaktadır.

2.3.10.2. Synaptophysin

Synaptophysin, hemen hemen tüm nöronlarda presinaptik veziküllerde bulunan bir integral membran glikoproteinidir. Bu glikoproteini işaretleyen antikolar, synaptophysinin aktif aminoasit dizininden seçilen hidrofilik bir peptid sekansı ile reaksiyona girer. Bu marker, nöronlar ile ilişkili sinapsları işaretler. Nöroblastomlar, ganglionöroblastomlar, ganglionöromalar, kromaffin ve non-kromaffin paragangliomlar, pheokromatomlar gibi birçok nöroendokrin neoplazmayı da işaretleyebilir. Diğer taraftan krista nöralis kökenli hücreleri; insan böbrek üstü bezi, karotid cisim, deri, tiroid, akciğer, pankreas ve gastrointestinal mukozadaki nöroendokrin hücreleri de işaretler. Ayrıca, hipofiz, pankreas, tiroid, akciğer, gastrointestinal sistem ve derideki epitelial nöroendokrin neoplazmalara da reaksiyon gösterir.

2.3. 10.3. Nestin

Nestin, 200 KD ağırlığındadır ve nöronal kök hücrelerde bulunur. Bu hücrelerin tanımlanmasında kullanılan spesifik bir perinükleer bir ara filamenttir. Nestin ince kıvrımlı fibriller olup dalgalı bir yapı gösterir. Nestin, MSS’de proliferen olan nöroepitelial multipotent prekürsör hücreler tarafından salgılanmaktadır. Nörulasyon sırasında gelişen MSS multipotent nöroepitelial hücrelerde de Nestin ekspresyonu görülmektedir. Nestin geni hem embriyoda hem de yetişkin MSS’inde bulunan kök/progenitor hücrelerinde eksprese olabilmektedir. Nestin ekspresyonu yeni doğan beyinde zayıflar, yetişkinde ise SVZ’de görülmeye devam eder [96, 121].

2.3.10.4 TGF- β 1

TGF- β 1'nin nöroprotektif ve nörodejeneratif yanıt düzenleyici (Hücre iskeleti gen ekspresyonu dahil), antienflamatuar, kemotaktik, antiproliferatif ve ekstraselüler matriksin yeniden yapılanmasını düzenleyici etki gösterdiği düşünülmektedir. MSS hasarında TGF- β 1'in yaygın etkileri ve glial skar oluşumunun düzenlenmesinde rolü pek çok kez bildirilmiştir, ancak fizyolojik ortamdaki yerine ilişkin yayın nispeten azdır. Cerebellum ve orta beyinden kaynaklanan nöronların TGF- β 1 salgılamak GFAP ekspresyonunu yüksek etkinlikte indüklenebilmektedir. Cerebellum'da Purkinje ve granüler hücrelerin TGF- β 1 salgıladıkları gösterilmiştir [130]. TGF- β 1 salınımı GFAP genini ve korteks astrositlerinin diferansiyasyonunu aktive ettiği gösterilmiştir [130].

2.3.10.5 Terminal deoksinükleotidil transferaz enzimi

Apoptotik sinyaller DNA üzerinde kırıklar oluşturmaktadır. Açığa çıkan DNA parçacıklarının serbest 3'-OH uçlarına terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) aracılığı ile biotin ile işaretlenmiş ve işaretlenmemiş deoksinükleotidler eklenir. Daha sonra biotin ile işaretlenmiş nükleotidler, Streptavidin-Horseradish peroksidaz konjugatı ile tespit edilir. Diaminobenzidine, işaretlenmiş örnek ile tepkimeye girerek DNA kırığı bölgesinde çözünemeyen bir substrat oluşturur.

2.2.11. APOPTOZİS

Hücre ölümü fizyolojik veya patolojik olabilir [45, 201]. Hücre ölümünün iki tipi vardır bunlar: Apoptozis ve Nekroz'dur [9, 216]. Her ikisinde de düzenli olarak birbirini izleyen biyokimyasal ve morfolojik olaylar sonucu hücre ölümü meydana gelir [107]. Programlanmış hücre ölümü, hücre intiharı, fizyolojik hücre ölümü apoptozis ile aynı anlamda kullanılan terimlerdir. Apoptozis'in daha önce hücre ölümünün sadece fizyolojik formu olduğu düşünülmesine rağmen bugün patolojik hücre ölümüne de aracılık ettiği bilinmektedir [146].

Kerr ve ark. 1972 yılında Apoptozis terimini ilk kez kullanmıştır [106]. Kerr, fizyolojik olarak ölen hücrelerin nükleuslarında yoğunlaşmış kromatin parçalarını gözlemlemiş ve organellerin iyi korunduğunu fark ederek bu olayı büzüşme nekrozu olarak adlandırmıştır. Bu fizyolojik olayın dokularda tek tek hücre kaybına yol açtığından hareketle latince ayrı düşmek anlamına gelen Apoptozis terimini kullanmıştır (Apo: ayrı, Ptozis: düşmek) [106].

Apoptozis klasik hücre ölüm şekli olarak bilinen nekrozdan birçok özelliği açısından oldukça farklı bir hücre ölüm mekanizmasıdır. Organizma sürekli bir denge halindedir. Yeni hücreler sentez edilirken, varolan hücrelerin bir kısmı hücre ölümü ile ortadan kaldırılmakta ve böylece sayısal denge korunmaktadır. Hücre proliferasyonu nasıl ki mitoz ile belirlenmekte ise belirli bir dokuda olması gereken hücre sayısı da apoptozis ile belirlenir [19, 49]. Apoptozis ve mitoz, dokuda sürekli bir denge halindedir [19, 129].

2.3.11.1 Apoptozis ve Nekroz Arasındaki Farklar

Apoptozis, hücrede yarattığı bu değişikliklerle nekrozun bir parçasıymış gibi algılanabilir. Nekroz ve apoptozis arasındaki morfolojik farklılıklar şunlardır:

- 1- Nekrozda membran bütünlüğü bozulur. Apoptoziste hücre membranında kabarcıklar görülür fakat, membran bütünlüğü bozulmaz [45, 201].
- 2- Nekroz sitoplazma ve mitokondrilerde şişme ile başlar, apoptoziste ise sitoplazmada büzülme ve çekirdek yoğunlaşması görülür [45].
- 3- Nekroz total hücre parçalanması ile sonlanır, oysa apoptozis hücrenin daha ufak fragmanlara dönüşmesi ile sonlanır (apoptotik cisimler) [45].
- 4- Nekrozda hücre membranında vezikül formasyonu yoktur, total parçalanma olur; oysa apoptoziste membrana bağlı veziküller oluşur [45].
- 5- Nekrozda organellerin devamlılığının bozulması mevcut iken, apoptoziste apoptozisi başlatan BCL-2 gen ailesinin ürettiği por oluşturan proteinlerin etkisi ile organeller bütünlüğünü korur, ancak delikli bir yapıya dönüşür [45, 201].

2.3.11.2 Apoptotik Hücrede Gözlenen Histopatolojik Değişiklikler

1. Yüzey Organellerinin Kaybı

Apoptozise uğrayan hücrenin komşu hücrelerle bağları kesilir. Hücre yüzeyindeki mikrovilluslar ve diğer hücrelerle yaptıkları özel bağlantılar ortadan kalkar. Hücre yüzeyi yuvarlaklaşır ve küçülmeye başlar [12].

2. Hücre Büzülmesi

Apoptotik hücre komşu hücreye göre daha küçük ve sitoplazması ise daha yoğundur. Endoplazmik retikulum dışında diğer hücre organelleri yapılarını korur

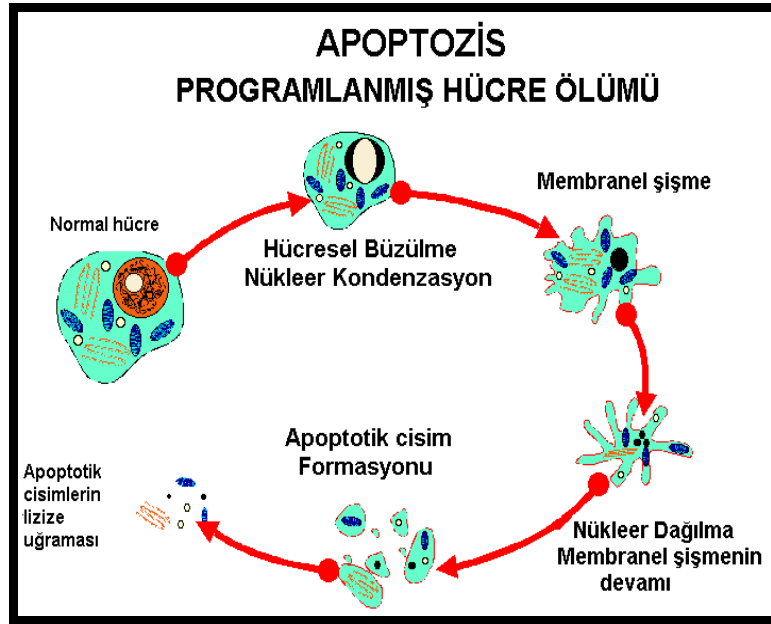
[45]. Sitoplazma yoğunluğu arttığı için organeller kalabalık görünür. Hücre zarı sağlam olduğundan nekrozda olduğu gibi bir inflamatuvar reaksiyon gözlenmez [45].

3. Kromatin Yoğunlaşması

Yapısal değişiklikler nükleustan başlayarak izlenir. Nükleus, apoptoziste odak noktasıdır. Hücreden hücreye değişmekle birlikte genellikle çekirdek büzülür [12, 45]. Kromatin çok yoğun bir hale gelir ve partiküller halinde bir araya toplanır. Nükleus porları seçilemez, şekli düzensizleşir ve ileri evrede küçük çekirdek parçalarına bölünür. Nükleolus genişler ve granülleri kaba granüller halinde dağılır [12].

4. Sitoplazmik Baloncuklar ve Apoptotik Cisimlerin Oluşması

Hücrede önce yüzeye doğru tomurcuklanmalar olur. Bunlardan bazıları sitoplazma parçacıkları içeren ve sıkı biçimde paketlenmiş organellerden oluşan membran ile sarılı apoptotik cisimlere dönüşür [12, 45, 49]. Apoptozis için morfolojik değişimler olan hücre büzülmesi, kromatin yoğunlaşması, hücre membranı tomurcuklanması olurken, fosfatidilserin açığa çıkar. Sağlıklı hücrelerde plazma membranının içinde bulunan fosfatidilserin apoptotik hücrelerde plazma membranının dış yüzünde bulunur ve fagositik hücreler için sinyal görevi görür (**Şekil 8**) [49, 127].



Şekil.8. Apoptozise uğrayan hücredeki morfolojik değişimler [248].

2.3.11.3 Nörogenezis ve Nörolojik Malformasyonların Oluşumunda

Apoptozis; Mekanizmaları ve Rolü

Gelişmekte olan sinir sisteminde apoptozis, doğal hücre ölümünün sonucu oluşan gerekli ve istenen bir durumdur ve doğal hücre ölümü yoluyla hatalı sinaps yapan veya hedefine ulaşamayan nöronların etkili bir şekilde yok edilmesini sağlar. Organizmanın diğer kısımlarında organogenez için gereklidir. Ekstremitelerin ve parmakların şekillenmesini sağlar. Çeşitli yapıların polaritesinin ayarlanmasında rol alarak hücre popülasyonlarının belirli bir yönde büyümesine aracılık eder [77]. Dikkatle ve efektif bir şekilde düzenlenmiş apoptozisin gelişmekte olan fetüste bozulması erişkinde ciddi ve uzun süren etkilere yol açar. Heterotopiler, şizensefali ve miyelomeningosel gibi pek çok konjenital beyin malformasyonları olasılıkla zayıf organize edilmiş ve/veya tam olmayan apoptozisle ilişkilidir. Radyasyon veya çeşitli kemoterapötik ajanlarla

kanser tedavisi sırasında bilinçli olarak apoptozis hızlandırılır [77]. Kanserlerin, apoptozisin kuralına uymaksızın gerçekleşmemesinden kaynaklandığına inanılmaktadır [77]. Erişkin cerebrum’unda nöronal ölümün istenmeyen ve uygunsuz bir şekilde gelişebildiğinin fenotipik göstergesi nörodejeneratif hastalıklardır [77].

Embriyonik kemirgen cerebral korteksinde apoptozise giden hücrelerin hafifçe yaygın ve tek tip bir görüntüsü vardır. Apoptotik hücre ölümü E14- 16 arasında pik yapar ve E10’da ve erişkinde neredeyse hiç ölü hücre yoktur. Postmitotik nöron içeren bölgelerde (marjinal zon, kortikal plak ve ara zon) bir çok ölmekte olan hücre gözlense de ölmek üzere olan hücrelerin çoğu proliferatif zondadır. Subplak ve kortikal plak arasındaki sınır bölgede apoptozise uğrayan bazı büyük nöronların subplak nöronları olduğu düşünülmektedir [5, 77]. Embriyonik korteksin proliferatif zonunda hücre ölümündeki artışın hızlı olmasının (ortalama yaklaşık % 50) nedeni açık değildir, ancak maksimum hücre ölümü döneminin (E12-E16) kabaca tüm terminal postmitotik nöronların oluştuğu dönem olan nöronogenetik intervale denk gelmesi oldukça ilginçtir [39]. Buna benzer bulgular insan fetüslerinde de gösterilmiştir [5]. Hamileliğin 12. haftasında VZ’de apoptotik hücreler bulunur ve 21. haftada pik yapar [198]. Çalışılabilen en ileri dönem fetüslarda (23 haftalık) apoptotik hücreler esas olarak subplağın derin bölgelerinde bulunur. Kemirgen embriyolarında olduğu gibi insan embriyonal korteksinde de programlı hücre ölümü en çok proliferatif zonda belirgindir. Ancak, proliferatif zonda bir hücrenin daha sonra hayatta kalıp kalmadığını belirleyen özelliklerin neler olduğu bilinmemektedir. Gelişmekte olan korteksin postmitotik bölgeleri arasında hücre ölümünün en fazla gözlemlendiği bölge subplaktır ve burada proliferatif zonla kortikal plak arasındaki tabakayı işgal eden

geçici bir nöron popülasyonu bulunmaktadır [5]. Bu hücrelerin hemen hemen hepsi postnatal hayatın erken dönemlerinde apoptozisle ortadan kaldırılır [164].

Postnatal hayatın ilk haftalarında cerebellum'da olgunlaşmış granüler hücre tabakasında belirgin bir hücre kaybı vardır. EGL'nin mitotik ve postmitotik bölgelerinde çok sayıda granüler nöronda DNA fragmentasyonu oluşur, bu olay en fazla P7. günde gözlenir. Apoptozisin nedeni granüler nöron popülasyonunun hedef hücreleri olan Purkinje hücrelerinin belli oranda ve uygun sayıda olmasının sağlanmasıdır. İnsan cerebellumun embriyonal gelişiminde ise kritik dönem 22-25. haftalar arasındadır. Bu dönemde cerebellumda oldukça yüksek oranda apoptotik hücreye rastlanır [147].

2.2.12. TGF- β Super Ailesi

TGF- β 'lar birden farklı sistem üzerinde ve birçok doku ve sistemin gelişiminde rol oynayan büyük bir ailenin üyeleridir [30, 131, 221]. Doku-spesifik bir şekilde eksprese edilen TGF- β ve ilişkili faktörler çok sayıda hücre ve dokuda önemli roller oynar. Bunların arasında hücre siklusu kontrolü, diferansiyasyon, erken gelişimin düzenlenmesi, ekstraselüler matriks oluşumu, angiogenezis, hematopoezis ve immün fonksiyonlar sayılabilir [30, 131]. Günümüzde TGF- β süper ailesinin 100 farklı proteinden oluştuğu bilinmektedir. Bunların yaklaşık 30 tanesi memelilerde bulunur. Bunlar arasında TGF- β lar (1, 2 ve 3 izoformları), aktivinler ve inhibinler, nodal, miyostatin, BMP, GDF'ler ve diğerleri sayılabilir [30, 131]. TGF- β 1 genellikle hasarla ilişkili bir sitokin olarak kabul edilmiştir, ancak son 3 yıl içinde bu sitokinin sinir sisteminin fizyolojisinde önemli rol

oynadığı anlaşılmıştır. TGF- β 1 ve reseptörlerinin MSS’de in vivo olarak dağılımı bu sitokinin beyin gelişiminde rol oynadığını düşündürmektedir [30, 85].

Yapılmış çalışmalar nörogenezisde ve hücre kaderine karar veren hücresel etkilerden, nörotropik faktörlere kadar uzanır [28, 178, 208, 228]. “Yönlendirici” ve “izin verici” faktörlerin ve sinyal iletim yollarının tanımlanması, bu biyolojik sürecin daha iyi anlaşılmasını kolaylaştırmasının yanısıra beyin nörodejeneratif hastalıklarında koruyucu ve tedavi edici hücre replasmanı stratejilerinin geliştirilmesine de yardımcı olacaktır. Son zamanlarda bu görüşü destekleyen en önemli bulgu; TGF- β 1 knockout farelerde kortikal gelişimde şiddetli bir bozulmanın ve nöronal ölüme ve mikroglioziste yaygın bir artışın gözlenmesidir [33, 85].

Geçen 15 yılda MSS gelişimi ve hastalıklarında glia fonksiyonlarının altında yatan mekanizmaları aydınlatmaya yönelik oldukça yoğun çalışmalarla glial hücreler destek dokusu elemanları olarak kabul edilmekteydi [69, 73, 74]. Günümüzde gliaların nöronal gelişimde anahtar rol oynadığı da düşünülmektedir. Bu yüzden astrositler nörogenezis, nöronal migrasyon, proliferasyon ve diferansiyasyon, nöronal sinyal iletimi, sinaps oluşumu, kan-beyin bariyerinin organizasyonu ve aksonal uzama gibi beyin gelişimiyle ilgili çok sayıda süreçte glial hücreler olarak katkıda bulunur [69, 73, 74, 86, 122, 156, 167].

TGF- β ’ların yukarıda sayılan etkilerinin yanı sıra embriyolojik gelişim proseslerini de düzenlediği düşünülmektedir. Çünkü, embriyogenezis sırasında yaygın olarak eksprese edilirler ve hücre büyümesi ve farklılaşması üzerinde pleotrofik etkileri vardır. TGF- β 1 ekspresyonu erişkin sıçanlarda hem granüler hem de Purkinje hücrelerinde gösterilmiştir [130].

Son yıllarda radyal glia gelişiminde TGF- β 1'in rolünü ortaya koyan çalışmalar yayınlanmaktadır. RGH'ler günümüzde nöronal kök hücreler olarak kabul edilmektedir. Ancak, bu hücreler aslında özelleşmiş glia hücreleridir. Ana görevleri gelişimin göç evresinde yapı iskeletinin oluşumda rol almaktır [59, 145, 167]. In vivo ortamda TGF- β ligandlarının ve reseptörlerinin gelişimsel kortekste oldukça yaygın dağılımı, TGF- β 'nın nöronal migrasyonda ve dolayısıyla radyal glial-nöronal etkileşimde aracı olabileceğini düşünülmüş, TGF- β 1'in nöron-astrocit etkileşimindeki yeni rolü tanımlanmıştır. Nöron- glia etkileşimleri beyin gelişiminde pek çok süreçte önemli rol oynamaktadır [122].

2.2.13. Kullanılan Deneysel Kortikal Displazi Modeli

Deneysel kortikal displazi modeli oluşturmak için çeşitli metotlar vardır. Bunlar arasında dondurma lezyonu [62, 91, 128], antimitotik bir ajan olan ve S fazında DNA'nın tek ipliğinin guanin nükleotidini metilleyen metilazomethanol asetat uygulanması [46, 78, 94, 98, 200, 218], radyasyon uygulaması [55, 112, 144, 181] ve antineoplastik ajanlardan nitrozoüre grubuna ait ve DNA alkilleyici özelliği bulunan Carmustine'in [22] hamilelik döneminde uygulanmasıyla oluşturulmaktadır.

Bu çalışmada Carmustine'in muadili olan Carmubris (BİCNU, Bristol-Myers Squibb) kullanılmıştır.

2.2.14 Deneyisel modelde kullanılan maddeler

2.2.14.1. Carmustine (Antineoplastik ajan) doz Hesaplanması

Bu çalışmada Carmustine dozu 20 mg/kg olarak belirlendi. Liyofilize edilmiş 100 mg Carmustine 3 ml saf distile etil alkol ile çözüldü. Daha sonra bu 10 ml ye serum fizyolojik aracılığı ile tamamlandı. Böylece 1 ml sinde 10 mg Carmustine içeren stok solüsyon elde edildi. Buna göre vücut ağırlıklarına göre hayvanlara verilecek Carmustine solüsyonu miktarı aşağıdaki gibidir.

210 gr	220 gr	230 gr	240 gr	250 gr	260 gr	270 gr
0,42 ml	0,44 ml	0,46 ml	0,48 ml	0,5 ml	0,52 ml	0,54 ml

2.2.14.2. Melatonin doz Hesaplanması

Bu çalışmada melatonin dozu 30 µgr/100 gr olarak belirlendi. Toz haldeki 15 mgr melatonin 1 ml % 2'lik saf etanol içinde çözüldükten sonra bu solüsyon 100 ml ye tamamlandı. Böylece 1 ml de 150 µgr melatonin içeren stok solüsyon hazırlandı. Buna göre vücut ağırlıklarına göre hayvanlara verilecek Melatonin çözeltisi miktarı aşağıdaki gibidir.

210 gr	220 gr	230 gr	240 gr	250 gr	260 gr	270 gr
0,42 ml	0,44 ml	0,46 ml	0,48 ml	0,5 ml	0,52 ml	0,54 ml

2.2.15 Antineoplastik ajanlar

Antineoplastik ajanlar genel etki mekanizmalarına göre altı gruba ayrılırlar:

- (1) Alkilleyici ajanlar
- (2) Antimetabolitler
- (3) Vinka alkaloidleri ve bitkisel kaynaklı ilaçlar
- (4) Sitotoksik antibiyotikler
- (5) Sis- platin ve diğer platin türevleri
- (6) Hormonlar ve hormon antagonistleri [31, 105].

2.2.15. 1. Alkilleyici İlaçlar

Birinci dünya savaşı sırasında zehirli gaz olarak kullanılan ve ciltte toksik vezikül oluşturan kükürtlü hardalın insanlarda lenfoid doku ve kemik iliğinde atrofi yaptığının saptanması, daha sonraki yıllarda azotlu hardal bileşiklerinin hem kimyasal savaş aracı olarak geliştirilmesine ve hem de deney hayvanlarındaki tümörlerde denenmesine yol açmıştır. Bu incelemeler sonucunda 1948’de bir azotlu hardal olarak Mekloreタミン adlı ilk alkilleyici ilaç klinikte kullanılmaya başlanmıştır ve böylece modern kanser kemoterapisi çağı açılmış oldu.

Alkilleyiciler, döneme özgü olmayan tipte ilaçlardır. Hücreleri mitozda hangi dönemde olursa olsunlar etkileyebilirler, ancak hücreler G_1 ve S dönemlerinde bu ilaçlara, diğer dönemlerde olduğundan daha fazla duyarlıdırlar. Bölünen hücrelerde sitotoksik etkileri çok belirgindir. Dinlenme (G_0) dönemindeki hücrelerde yaptıkları sitotoksik etki bu hücreler bölünmeye başlayana kadar gizli kalır. Bu ara dönemde DNA onaran enzimler tarafından ortadan kaldırılması mümkündür [105].

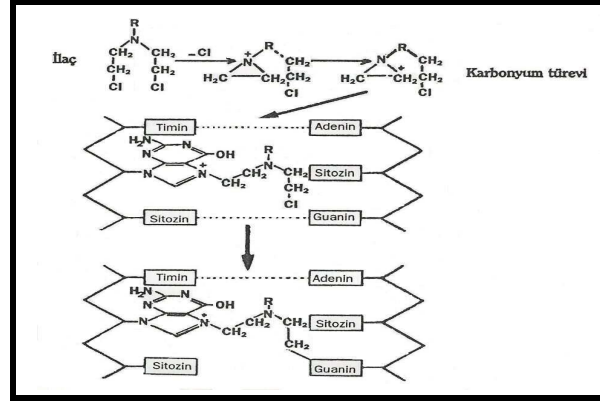
2.2.15. 2. Etki Mekanizmaları

Bütün bu maddeler kanserli hücrelerde kendilerine uyan türevlerine ve daha sonra pozitif yüklü karbon içeren karbonyum türevlerine dönüşürler. Karbonyum iyonu, güçlü elektrofilik özelliği olan reaktif bir metabolittir ve negatif yükle nükleik asidlerin (özellikle DNA'nın) ve diğer makromoleküllerin içerdiği nükleofilik gruplara (amino, fosfat, tiyol, hidroksil, imidazol ve karboksil grupları için) kovalant bağla irreversibl bağlanır. Sonuçta, bu makromoleküller alkillenmiş olur. Alkilleyici kanser ilaçlarının çoğu bifonksiyonel niteliktedirler ve DNA çift-zincirlerine iki noktadan bağlanırlar. Hem monofonksiyonel ilacın DNA'ya bağlanması hem de çoğu zaman olduğu gibi bifonksiyonel ilacın bağlanmasıyla oluşan alkilleme sonucu DNA'nın transkripsiyon ve replikasyonunu bozar veya olanaksız hale getirir. DNA molekülünde aşağıdaki üç önemli değişiklikten birine yol açar:

- 1) Guanin'in N'den alkillenmesi sonucu anormal baz çiftinin oluşması, genetik kodun yanlış okunması ve transkripsiyon sırasında guanin'in adenin gibi görünmesine ve okunmasına neden olur. Bu olay, yeni DNA zincirinde ve mRNA moleküllerinde önemli bozukluklara yol açar.
- 2) Guanin'in imidazol halkası açılır, Guanin ortadan kalkarak DNA zinciri buradan kırılmış olur.
- 3) Reaktif metabolit iki ayrı zincirdeki guanin arasında köprü yapar ve dolayısıyla DNA'nın replikasyonu ve transkripsiyonu mümkün olmaz.

X ışınlarına maruz bırakılan hücrelerdekine benzer şekilde bu ilaçlar protein ve enzimleri alkillyerek hücrelerde solunum ve ara metabolizmayı bozarlar (**Şekil 9**). O nedenle alkilleyici ilaçlara radyomimetik ilaçlar da denilir.

Antineoplastik ilaçların DNA molekülünü etkilemesinin, çapraz-bağlanmayı andıran, fakat aslında farklı olan bir şekli interkalasyon'dur. Sonuçta, DNA'nın replikasyonu ve transkripsiyonu inhibe edilir. Ancak, alkilleyici ilaçlar interkalasyon yapmazlar [105].



Şekil 9. DNA çift zincirinin polifonksiyonel bir ilaç tarafından etkilenmesi [105]

2.2.15.3 Farmakokinetik özellikleri

Alkilleyici ilaçların çoğu, sulu ortamda reaktif ürün olan karbonyum türevine veya benzeri türevlere yavaş olarak dönüştüklerinden, vezikan (epiteli yıkıcı) bir etki oluşmaksızın rahatlıkla ağızdan verilebilirler. Bunların ağız yolundan veya doku içine verilmeleri olanaksızdır; sadece intravenöz yoldan ve genellikle dilüe edildikten sonra yavaş i.v. infüzyonla verilirler. Alkilleyici ilaçların bu yoldan verilişlerinde, bazılarında bulunan oldukça güçlü tahriş edici etkiye karşı tedbirli olunmalı ve ilaç solüsyonunun damar dışına kaçmasına engel olunmalıdır. Bu ilaçlardan bazıları kanserli olgularda plevra ve periton boşluğunda toplanan sıvı içine verilebilirler. Yüzeyel tümörlerde, tümör dokusu

içine de enjekte edilebilirler. Ekstremitelerdeki neoplazmalarda intraarteriyel olarak kullanılabilirler. Carmustine'nin ait olduğu nitrozoüre grubu alkilleyici ilaçlar plasental yol ile yavruya geçer [105, 237].

2.2.15.4. Sınıflandırılmaları

Alkilleyici ilaçlar kimyasal yapılarına göre 5 alt gruba ayrılırlar.

- 1. Azotlu hardal'lar (Biskloretilaminler):** Bunlar Siklofosfamid, İfosfamid, Mekloretilamin (Mustin), Melfalan ve Klorambusil'dir.
- 2. Etileniminler ve Metilmelanaminler:** Bunlar aziridin (Tiotepa, Tiofosforamid) ve Altretamin (Heksametilmelamin)'dir. Plevral ve peritoneal malign efüzyonların içine (intrakaviter) ve mesane mukozasının yüzeyel tümörlerinde ve ilerlemiş ovaryum kanserlerinin tedavisinde intravezikal olarak lokal uygulanır.
- 3. Alkil Sülfonatlar:** Bu alt grupta halen kullanılan tek bir ilaç (Busulfan) vardır. Busulfan: Ağız yolundan uygulanan bi fonksiyonel bir alkilleyici ilaçtır. Geçmişte kronik myeloid löseminin tedavisinde tercih edilen ilk ilaçtı.
- 4. Nitrozoüreler:** Bunlar, kloroetil türevi nitrozoüreler olan Carmustine (BİCNU), Lomustin (CCNU) ve Semustin (metil CCNU) dur. Kloroetil türevi nitrozoüreler stabil olmayan bileşiklerdir ve fizyolojik koşullarda spontan olarak, alkilleyici ve karbamolleyici ara ürünlere dönüşürler. Bunlar nükleusta makromolekülleri aşağıdaki şekillerde etkileşirler:

- 1) DNA ve proteinleri monofonksiyonel olarak alkilerler
- 2) DNA zincirleri arasına köprü kurarlar (Bifonksiyonel alkilleme)
- 3) DNA zinciri ile proteinler arasında çapraz-bağ kurarlar
- 4) DNA zincirini kırarlar

5) Proteinleri karbamoller

Nitrozoüreler fazla lipofilik bileşiklerdir. Mide-barsak kanalından iyi absorbe edilirler. Kan- beyin bariyerini geçip MSS'ye girebilirler. MSS malign tümörlerinde yararlıdırlar. Diğer alkilleyici ilaçlara oranla kemik iliğini daha fazla deprese ederler. Yaptıkları lökopeni 4-6 haftada, trombositopeni ise 3-5 haftada en düşük düzeye iner; sonra genellikle 1-2 haftada düzelir. diğer alkilleyici ilaçların çoğu gibi teratojenik, mutajenik ve karsinojenik etkileri vardır. Nefrotoksiktirler.

Carmustine: Ağız yolundan hızlı absorbe edilmekle beraber sadece i.v. infüzyonla uygulanır; vücutta çok çabuk metabolize edilir. Hepatotoksik potansiyeli vardır.

Lomustin: Ağız yolundan kullanılır; diğer özellikleri Carmustine'dekilere benzer. Nörotoksik potansiyeli vardır.

Semustin: Lomustin'in metil türevidir. Onun gibi ağız yolundan kullanılır. Daha toksiktir.

5. Triazen ve hidrazin türevleri: Bunlar bir triazen türevi olan dakarbazin ve bir metilhidrazin türevi olan prokarbazin'dir [105].

2.2.15.4.1 Carmustine (BiCNU)

Enjeksiyonluk bir Carmustine formu olan BiCNU, çeşitli neoplastik hastalıkların tedavisinde kullanılan bir nitrozoüre türevidir. Kimyasal yapısı 1,3-bis (2-kloroetil)-1-nitrozoüre'dir. Liyofilize formu soluk sarı pulcuklar şeklindedir ve molekül ağırlığı 214.06 gramdır. Alkol ve yağlarda oldukça iyi çözünürken suda çözünürlüğü düşüktür. Enjeksiyonluk vialler içinde 100 mg tek dozluk

liyofilizat şeklinde bulunur ve uygun şekilde hazırlandıktan sonra intravenöz infüzyonla uygulanır [105, 237].

2.2.15.4.2 Farmakolojik Özellikleri

Carmustine'nin DNA ve RNA'yı alkillleyen bir ajandır. Diğer nitrozoüre türevlerinde olduğu gibi proteinlerdeki aminoasitleri karbamollenmesine neden olarak çeşitli kilit enzimatik reaksiyonları inhibe eder.

Intravenöz uygulandığında Carmustine hızla parçalanır ve 15 dakika içinde dolaşımdan tamamen kaybolur. Ancak C¹⁴ işaretli ilaçla yapılan çalışmalar, ana bileşiğin radyoaktif fragmanlarının varlığı nedeniyle izotopun uzun bir süre daha plazma ve dokularda bulunabilirliğini göstermektedir. Carmustinin antineoplastik ve toksik etkilerinin bu aktif metabolitlere bağlı olduğu düşünülmektedir. Toplam dozun yaklaşık % 60-70'i 96 saat içinde idrarla atılır, % 10'u solunum havasında saptanır, kalan ilacın ne olduğu bilinmemektedir.

Yağda eriyebilirliğinin çok yüksek, fizyolojik pH'da iyonizasyonun çok düşük olması nedeniyle Carmustine kan-beyin bariyerini ve plasental yolu rahatlıkla aşar, BOS'daki radyoaktivite düzeyi plazmadakinin % 50'sine eşit veya fazladır.

2.2.15.4.3. Endikasyonları ve Kullanımı

BİCNU palyatif tedavide tek ajan olarak veya diğer kemoterapötiklerle birlikte kombine tedavide aşağıdaki endikasyonlarda kullanılmaktadır:

1. Beyin tümörleri-glioblastom, beyin sapı gliomu, medullablastom, astrositom, ependimom ve metastatik beyin tümörleri
2. Multipl miyelom-prednizonla kombine
3. Hodgkin hastalığı-etkinliği kanıtlanmış ilaçla primer tedavi görürken relaps olan veya primer tedaviye yanıt vermeyen hastalarda
4. Non-Hodgkin lenfomalar. etkinliği kanıtlanmış ilaçla primer tedavi görürken relaps olan veya primer tedaviye yanıt vermeyen hastalarda kullanılır.

2.2.15.4.4 Yan Etkiler

Pulmoner Toksisite: Pulmoner toksisite pulmoner infiltrasyon ve/veya fibrozisle karakterizedir ve BİCNU ve benzeri nitrozoürelerle tedavinin başlangıcından sonraki 9. gün ile 43. hafta arasında ortaya çıkar. Toksisite gelişen hastaların çoğu uzun süreli olarak 1400 mg/m^2 'nin üstünde dozda ilaç almaktadır. Ancak daha düşük dozda tedavi alan hastalarda da pulmoner fibrozis görülebilmektedir. Diğer risk faktörleri arasında tedavinin süresi ve geçirilmiş akciğer hastalığı hikayesi sayılabilir. BİCNU ile fatal pulmoner toksisite vakaları tanımlanmıştır.

BİCNU'yu çocukluk ve erken ergenlik çağında (1-16 yaş) $770\text{-}1800 \text{ mg/m}^2$ dozlarda ve intrakraniyal tümör nedeniyle kranial radyoterapiyle birlikte uzun

sürelili kullanan hastalarda yapılan çalışmalarda gecikmiş pulmoner fibrozis saptanmıştır. Göğüs radyogramlarında üst zonda kontraksiyonla seyreden pulmoner hipoplazi gözlenmiştir. Tüm hastalarda pulmoner fonksiyon testlerinde gecikmiş bir yavaşlama saptanmıştır. Yavaş bir progresyon gösteren bu tür akciğer fibrozisi bazı vakalarda ölümle sonuçlanmaktadır.

Hematolojik Toksisite: BİCNU'nun en sık ve ciddi toksisitesi miyelosupresyondur, zaten baskılanmış olan hastada ciddi kanamalara ve sık enfeksiyonlara neden olur. Genellikle ilaç uygulamasından 4-6 hafta sonra başlar ve doza bağımlıdır. Uygulamadan sonraki 4. haftada trombositopeni gözlenir ve 1-2 hafta sürer. Lökopeni 5-6 hafta sonra başlar ve 1-2 hafta sürer. Trombositopeni genellikle lökopeniye oranla daha ciddidir ancak her ikisi de doza bağımlıdır. BİCNU kümülatif miyelosupresyon oluşturabilir, tekrarlayan dozlarda supresyon daha belirgindir ve daha uzun sürer. Uzun süreli nitrozoüre tedavisi alan hastalarda akut lösemi ve kemik iliği displazisi de tanımlanmıştır.

Gastrointestinal Toksisite: İntravenöz BİCNU uygulamasından sonra bulantı ve kusma olabilir. İlaç uygulamasından 2 saat sonra başlar, 4-6 saat sürer ve doz bağımlıdır.

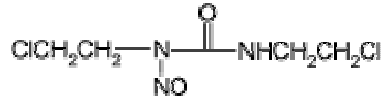
Hepatotoksisite: BİCNU alan hastaların az bir kısmında transaminazlar, alkalen fosfataz ve bilirubin düzeylerinde artışla ortaya çıkan reversibl karaciğer toksisitesi bildirilmiştir.

Nefrotoksisite: Yüksek ve kümülatif dozlarda BİCNU ve benzeri nitrozoürelerle uzun süreli tedavi alan hastalarda progresif azotemi, böbrek boyutlarında küçülme, hasar ve renal yetmezlikle karakterize renal anomaliler bildirilmiştir.

Diğer Toksisiteler: Sulandırılmış BİCNU preparatları kazayla ciltle temas ettiğinde etkilenen bölgede yanma ve hiperpigmentasyona neden olabilir.

İntravenöz BİCNU infüzyonu hızlı uygulandığında 2 saat içinde ciltte belirgin kızarıklık, konjunktivada kızarıklık ve yaşlanmaya neden olur ve bu tablo, 4 saat sürer. Enjeksiyon yerinde yanma olabilir, tromboz ender gözlemlenir.

Diğer yan etkiler arasında nöroretinitis, göğüs ağrısı, baş ağrısı, allerjik reaksiyonlar, hipotansiyon ve taşikardi sayılabilir.



Şekil 10.Carmustine'nin (BiCNU) kimyasal yapısı

2.2.15.4.5 Onkolojik Dozaj ve Uygulama

Daha önce tedavi almamış hastalarda tek ajan olarak kullanıldığında önerilen BİCNU dozu 6 haftada bir 150-200 mg/m²'dir. Bu doz tek doz olarak uygulanabilir veya günde 75-100 mg/m² dozda iki gün verilebilir. Diğer miyelosupresif ajanlarla kombine verildiğinde veya kemik iliği rezervi tamamen boşalmış olan hastalarda kullanılır.

2.2.15.4.6 İntravenöz Solüsyonların Hazırlanması

BİCNU önce ambalajda temin edilen 3 ml'lik steril çözücü (dehidrate alkol) içinde çözülür. Daha sonra aseptik koşullarda 27 ml steril enjeksiyonluk su ile sulandırılır. Bu solüsyonun her ml'sinde % 10'luk alkol içinde 3.3 mg BİCNU bulunmaktadır. Bu solüsyonların ışıktan korunması gerekir.

Önerilen şekilde hazırlanan solüsyonlar renksiz veya hafif sarımsı renkli ve berraktır. Daha sonra % 5'lik dekstroz çözeltisi içinde dilüe edilir. Parenteral ilaç

solüsyonları özellikle partikül oluşumu veya diskolorasyon (renk değişimi) açısından gözlenmelidir.

Önemli Not: Liyofilize dozaj formları koruyucu madde içermemektedir ve çoklu doz viali olarak kullanılması önerilmez.

Stabilite: Açılmamış kuru ilaç içeren vialler buzdolabında (2-8°C) saklanmalıdır ve uygun koşulda saklandığında 3 yıl süreyle stabildir. Önerilen şekilde vial içinde sulandırılan BİCNU solüsyonları ışıktan korunmak koşuluyla oda sıcaklığında (25°C) 8 saat stabildir. Enjeksiyonluk su ve daha sonra % 5 dekstroz çözeltisi içinde 0.2 mg/ml konsantrasyonda sulandırılan solüsyon ışıktan korunarak oda sıcaklığında saklanmalı ve 8 saat içinde tüketilmelidir. İlacın stabilitesi için uygulama esnasında cam kaplar kullanılmalıdır.

Önemli Not: BİCNU'nun kaynama noktası düşüktür (30.5-32.0°C). Viallerin kaynama noktası üstündeki sıcaklıklara maruz kalması ilacın sıvılaşması ve vial üstünde yağlı film görüntüsü almasına neden olur. Bu görüntü ilacın dekompoze olduğunu gösterir ve vialin atılması gerekir. İlaç temin edildiğinde buzdolabında saklama koşullarına uyulup uyulmadığı kontrol edilecekse her karton içindeki en büyük vial incelenmelidir. Vial parlak ışığa doğru tutulur ve dibinde ince, kuru pulcuklar veya kitle şeklinde çökeltiler tarzında liyofilize BİCNU'nun varlığı gözlemlendiğinde ilacın kullanıma uygun olduğu anlaşılır ve hemen buzdolabına kaldırılmalıdır.

Her BİCNU kutusunda 100 mg Carmustine içeren vial ve 3 ml steril çözücü içeren vial bulunmaktadır. Her ambalajda 10 kutu vardır. Kuru vialler buzdolabında (2-8°C) saklanmalıdır.

2.2.16 MELATONİN

1958 yılında keşfedilen bir hormon olan pineal bezin temel salgı maddesi Melatonin (*N-acetyl-5-methoxytryptamine*), son yıllarda güçlü bir serbest radikal çöpçüsü ve antioksidan olarak oldukça ilgi çekmektedir [158, 175]. Melatonin oksidatif stresi çeşitli şekillerde azaltır. Hidrokloröz asiti ortamdan hızla uzaklaştırarak katalazın bu molekül tarafından inaktive edilmesini engeller. Melatonin'in hidroksil ve peroksil radikallerini detoksifiye ettiği in vitro olarak gösterilmiştir [157, 211, 212]. Daha da önemlisi melatonin, hidrojen peroksiti direk olarak ortamdan temizler, endojen bir antioksidan enzim olan glutatyon peroksidaz aktivitesini stimüle eder, pekçok koruyucu enzimin gen ekspresyonlarını düzenler ve lipid peroksidasyonunu azaltır [17, 79, 172, 173]. Serbest radikalleri temizleme kabiliyetinin yanısıra melatoninin nötrofil birikimini azaltıcı bir etkisi olduğu da bulunmuştur [175]. Amfibilerde, melanoforları etkileyerek deri rengini açtığı düşünüldüğünden “mela-”, serotonininden türediği için de “-tonin” kelimeleri birleştirilerek melatonin adı verilmiştir [117]. Vücutta, endojen melatonin'in çoğu pineal bez tarafından sentezlenmekle birlikte, diffüz nöroendokrin sistem ve hematopoietik sistem hücrelerinin de önemli bir melatonin sentez yeri olduğu gösterilmiştir [120]. Göze gelen fotik stimülasyon sonucu retinohipotalamik traktuslar ile hipotalamus'daki suprakiazmatik nukleus aktive olmaktadır. Daha sonra, medulla spinalis yolu ile superior servikal ganglion'a gelen pre-ganglionik liflerle, ganglion hücrelerine ait post-ganglionik sempatik lifler pineal sap yoluyla pineal bezdeki pinealositlerle sinaptik bağlantılar yapmaktadır [65].

Pinealosit'lerde üretilen melatonin çok hızlı bir şekilde bu hücrelerin komşuluğunda yer alan kapillerlere bırakılarak sistemik kan dolaşımına karışmaktadır [65]. Melatonin'in lipofilik özelliği nedeniyle, vücuttaki tüm doku ve sıvılara kolayca dağılabilir.

Melatonin sentez ve salınımı ışık miktarı ile yakın bir ilişki göstermektedir. Gece maksimum düzeye ulaşmakta, gündüz ise minimum düzeye inmekte ve bu durum sirkadiyen salınım ritmi olarak bilinmektedir [157, 199]. Sistemik kan dolaşımı, pineal bez, cerebrospinal sıvı, idrar ve hücre içindeki melatonin konsantrasyonu geceleri, gündüz ölçülen melatonin düzeyinin 10 katına kadar ulaşabilen bir artış göstermektedir [177]. Yaş ile yakından ilgilidir. Yaşlanma ile melatonin sentez ve salınımında azalma olur. Erişkin bir insanda gece ölçülen serum melatonin düzeyi 50-70 pg/ml'dir [157]. Deney hayvanlarında, hayvan yaşlandıkça sirkadiyen ritmin bozulduğu, gündüz ve geceye ait serum melatonin düzeylerinin hemen hemen eşit bir hale geldiği saptanmıştır [175, 177]. Pineal bezden sistemik kan dolaşımına verilen melatonin, karaciğer ve böbreklerde metabolize olmaktadır [176, 177]. Melatonin hormonu hedef dokulardaki etkisini, bu dokularda yer alan spesifik reseptörler aracılığı ile göstermektedir. Melatonin'in çok değişik etkileri olduğu ileri sürülmektedir: serbest radikal giderici, rejenerasyonu stimüle edici, nöroprotektif ve anti-toksik bir ajan, uyku ritmi ve endokrinolojik aktivite düzenleyicisi, osteoblastik aktivite hızlandırıcısı, bağışıklık sistemi güçlendiricisi, anti-kanserojen, antiepileptik ve hipotermik bir ajan [2, 157, 177, 199] olarak iş görür.

2.2.17. SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİ

Atomlarda elektronlar yörünge adı verilen uzaysal bölgede çift olarak bulunmaktadır. Elektronların kapladıkları bölgeler orbital olarak tanımlanmaktadır. Bir orbitalde tek başına bulunan elektron, eşlenmemiş elektrondur. Son yörüngelerinde çift elektron bulunan birçok molekülün yanı sıra az sayıdaki molekülün son yörüngesinde tek elektron yer almaktadır. Son yörüngelerindeki elektronları eşlenmemiş olan bu moleküller, herhangi bir molekül ile etkileşime girerek elektron almakta (yükseltgenme) veya elektron vermektedirler (indirgenme). Başka moleküller ile çok kolay elektron alışverişine girerek yapılarını bozan moleküllere “serbest radikaller”, “oksidan moleküller” veya “reaktif oksijen partikülleri” adı verilmektedir [116, 134].

Oksijenin bir elektron ile tam olmayan indirgenmesi sonucu oksijenin aktif türleri olan oksijen radikalleri oluşmaktadır. Oksijeni metabolize edebilen tüm canlılarda oksijen radikalleri üretilmektedir. Oksijen radikali, serbest elektronunu eşlemek için elektron aldığı bir başka molekülü dayanıksız hale getirmektedir. Elektron düzeni bozulan bu molekül bir başka molekülden elektron alarak düzenini sağlamaktadır. Bu nedenle serbest radikaller, vücutta önemli moleküllere zarar veren bir dizi tepkimeyi başlatabilirler. Patolojik etkilerin ortaya çıkmasına oksijen radikallerinin sayısının artması neden olmaktadır. Oksijen radikallerinin hasara yol açtığı moleküller arasında proteinler, nörotransmitterler, nükleik asitler ve yağ asitleri bulunmaktadır [92].

2.2.17.1 Serbest Radikallerin Tepkimeleri

Eşlenmemiş elektronlarını birleştiren iki radikal, kovalent bağ oluşturacak şekilde birleşebilmektedir. Radikal olmayan moleküller, elektron eksikleri olmadığı halde başka moleküllerle radikallerden daha zayıf bir şekilde birleşmektedir. Bir radikal, radikal olmayan moleküle elektron verebilmekte (indirgen radikal), elektron alabilmekte (oksidan radikal) veya onunla birleşebilmektedir. Serbest radikaller bu üç tepkime ile radikal olmayan moleküllerin radikale dönüşmesini başlatmakta ve bir dizi zincirleme tepkime sonucu serbest radikallerin sayısı artmaktadır [92].

Dış yörüngesinde eşlenmemiş iki elektron içeren moleküler oksijenin yapısındaki her iki atom denge halinde bulunduğundan oksijen molekülü reaktif özellik taşımamaktadır. Peroksit iyonu ortamdan iki proton alarak hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşturabilmektedir. Süperoksit radikallerinin ortamdan uzaklaştırıldığı bu dismutasyon tepkimesini süperoksit dismutaz (SOD) katalizlemektedir.

Canlılarda çok sayıda işlevi bulunan sülfidril grupları ile metal iyonlarını etkileyen serbest radikaller, metabolik olayları ve yükseltgenme-indirgenme tepkimelerini değiştirerek çok sayıda zararlı etkiye yol açmaktadır [236]. Süperoksit radikali, damar dokusunda mevcut oksidanların çoğunun temel üreticisidir. Damar endotelinden salıverilen gevşetici bir faktör olan NO ile tepkimeye giren süperoksit radikali, reaktif bir ara ürün olan ve güçlü oksidan etkisi ile bilinen peroksinitriti ($ONOO^-$) oluşturmaktadır. Bir çok biyomoleküle zarar veren peroksinitrit, asit ortamda yıkılarak hidroksil radikali meydana getirmektedir [236].

Serbest Oksijen Radikallerinin Organizmadaki Etkileri

Serbest oksijen radikallerinin organizmada yararlı ve zararlı etkileri bulunmaktadır.

Serbest radikallerin yararlı etkileri: Vücuttan atılabilmeleri için sitokrom p450 enziminin katalizlediği bir tepkime ile hidroksilasyona uğrayan ksenobiyotikler, daha sonra konjugasyon ve metilasyon tepkimeleri ile suda daha çözünür hale getirilerek atılırlar. Bu detoksifikasyon işlemi sırasında reaktif oksijen türleri tepkime döngüsünde merkezi rol oynarlar [43] .

Damar endotelinden salıverilen reaktif bir oksijen türü olan NO, damar düz kasının gevşemesine neden olmakta ve trombosit agregasyonunu inhibe etmektedir. Nitrogliserin ve nitroprusit gibi vazodilatör nitratlar, NO'ya metabolize olarak etki gösterirler. Ayrıca, beyinde nörotransmitter olarak görev yapan NO, makrofajların bakterisidal ve tümörisidal etkilerine aracılık eder [43]. Nötrofiller ve monositlerin bakterisidal etki gösterebilmeleri için miyeloperoksidazın yer aldığı oksijene bağımlı bir mekanizma kullanmadırlar. Burada lökosit membranındaki NADPH oksidaz ile moleküler oksijenden oluşan süperoksit radikalinden süperoksid dismutaz ile elde edilen H_2O_2 , miyeloperoksidaz katalizörlüğünde bakterileri öldüren hipokoröz asidi oluşturmaktadır [43].

Serbest radikallerin zararlı etkileri: Oksijen kaynaklı serbest radikaller, hücre hasarı ve hücre ölümü için önemli mediyatörlerdir. Yaşlanma prosesinde rol oynayan birçok reaktif kimyasal bileşik, doğrudan veya dolaylı olarak ateroskleroz, reperfüzyon hasarı ve kanser gibi daha birçok hastalığı içeren süreçlerde yer almaktadır [53].

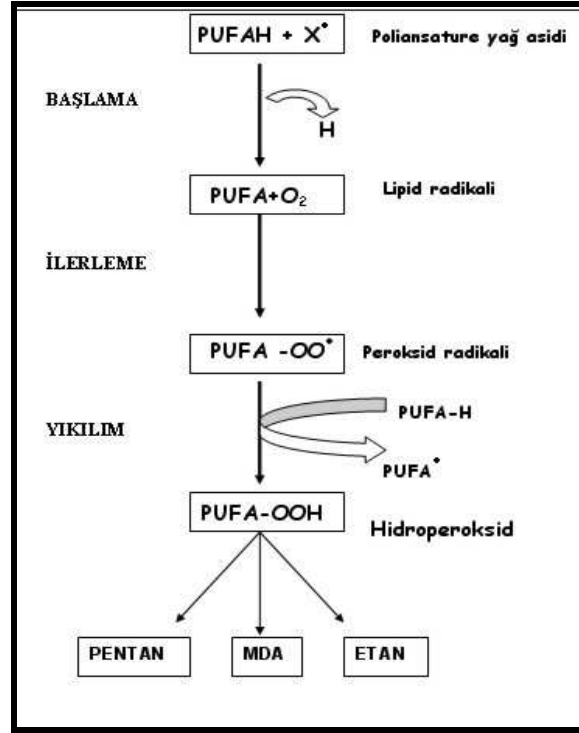
Biyolojik yapılarda, özellikle membranlarda yüksek oranda bulunan doymamış lipidler serbest radikallerle oksidasyona uğrarlar. Lipid peroksidasyonu serbest radikaller tarafından oluşturulan süreçler içinde en yoğun şekilde araştırılanıdır. Genellikle radikallerin ve daha spesifik olarak reaktif oksijen türlerinin oluşturulduğu bölgelerde membran fosfolipidlerinin çok miktarda olması, fosfolipidleri radikaller için kolay ulaşılabilir hedefler haline getirmektedir. Özellikle serbest radikal tepkimelerine çok duyarlı olan poliansatüre yağ asitlerinin peroksidasyonu bir radikal zincir peroksidasyonuna yol açabilmektedir [53].

2.2.17.2 LİPİD PEROKSİDASYONU

Poliansatüre yağ asitlerinin oksidatif yıkılımı olarak tarif edilen ve zincirleme gerçekleşen bir dizi tepkimenin yer aldığı lipid peroksidasyonunu demir ve bakır gibi iz metaller, ultraviole veya radyasyon katalizleyebilir. Lipid peroksidasyonu zincir başlangıcı, ilerlemesi, dallanması ve sonlanması olarak bilinen dört aşamada gerçekleşmektedir.

Sonlanma aşamasında hidroperoksitler ısı, radyasyon, metal iyonları katalizörlüğünde yıkılarak lipid peroksidasyon ürünlerini meydana getirmektedirler (**Şekil 11**) [43].

Lipid hidroperoksitlerinden lipid oksi radikali ($LO^{\bullet}$) ve hidroksil radikali ($OH^{\bullet}$) oluşması sırasında iki değerlikli demir (Fe^{+2}) yükseltgenerek (Fe^{+3}) meydana gelmekte ve peroksidasyon zinciri dallanmaktadır. Bu olay deney hayvanlarında ve insanlarda radikallerin neden olduğu hasarın ve toksisitenin göstergesi olarak kabul edilir [43].



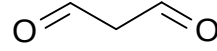
Şekil 11 Lipid peroksidasyonunun şeması

2.2.17.2.1 MDA

Peroksidasyona uğramış olan poliansatüre yağ asitlerinden oluşan reaktif bileşiklerden biri olan üç karbonlu MDA bir ketoaldehiddir (**Şekil 12**). Araşidonik asidden, birçok lipoksidden, hidroperoksitlerden, endoperoksitlerden, prostaglandinlerden ve tromboksanlardan oluşabilen MDA'nın ana kaynağı ansatüre yağ asitlerinin peroksidasyonudur [183].

Birçok makromolekül ile hızlı bir şekilde tepkimeye giren ve çok reaktif bir bileşik olan MDA, serbest olarak veya farklı doku bileşenleri ile kompleks oluşturmaktadır. Doku lipid peroksidasyonu sonucu oluşan MDA hücresel düzeyde metabolize edilir. Karaciğer aldehid dehidrogenazı tarafından enzimatik yıkılıma uğrayan MDA, CO₂'e metabolize olmakta veya mitokondriyal yolla

yıkılabilmektedir. İdrarda asit ile hidrolize edilebilen formda küçük miktarlarda ekskrete edilir. Eritrosit membranının aminofosfolipid organizasyonunu bozan MDA, hücre hasarında ve yaşlanma pigmenti olan lipofuksinlerin oluşumunda etkili gösterilmiştir. MDA'nın mutajenik olduğu ve kimyasal karsinojen gibi davrandığı da bilinmektedir [225].



Şekil 12 MDA'nın kimyasal yapısı.

Biyolojik örneklerde lipid peroksidasyonunun ve serbest radikal aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan en kolay ve yaygın yöntem, MDA'nın TBA ile tepkimesidir [97]. Lipid peroksidasyonunun belirlenmesi için kullanılan ve spesifik olmayan bir yöntem olmasına rağmen TBA tepkimesi, MDA üretiminin iyi bir göstergedir. Ayrıca, TBA testinin kaynatma aşamasında daha önce oluşmuş olan lipid hidroperoksidlerinin yıkılımı sonucunda artefakt bir MDA üretimi olmaktadır. Okside lipidlerde bulunan 2,4-alkadienler ve 2-alkenaller de TBA ile pozitif sonuç vermektedir. HPLC, serbest MDA ölçümünde en güvenilir yöntemdir.

2.2.17.2.2 SOD

Süperoksidin protonlanmış formu olan HO_2 ile doğrudan oksitleme, bakır (Cu^{+2}) ile demir (Fe^{+2}) gibi metallerle veya seruloplazminle katalizlenen tepkimeler ve $\text{NO}^\bullet$ ile $\text{O}_2^{\bullet -}$ arasındaki tepkimelerde oluşan reaktif peroksinitritler aracılığıyla LDL değişikliğe uğramaktadır. Damar duvarındaki $\text{O}_2^{\bullet -}$ kaynakları arasında endotel hücreleri, düz kas hücreleri, makrofajlar ve adventisyal

fibroblastlarda bulunan NAD(P)H oksidazlar, lipoksijenazlar, ksantin oksidazlar, ve NO sentazlar bulunmaktadır [194].

Süperoksid anyon radikallerine karşı ana savunma aracı olan SOD, süperoksidin hidrojen perokside dismutasyonunu katalizleyen bir metalloenzimdir. Genetik olarak 21. kromozomda lokalizedir [44]. SOD tarafından katalizlenen tepkimenin hızı $2 \times 10^9/\text{ms}$ 'dir. Hücre içi SOD aktivitesindeki artış dioksijenin toksisitesine karşı gelişen bir direnç artışına neden olur [183].

3. BÖLÜM II

3.1 GEREÇ YÖNTEM

3.1.1.Deneysel Gereç

- Sıçan (Wistar tipi albino 30 adet dişi, 10 adet erkek sıçan)
- Deney kafesi (19x12x12 cm)
- Hassas terazi (Precia XB-220A)
- Pamuklu çubuk (STP-PEN for Males)
- Giemza boyası (% 5 lik mikroskopik boya solüsyonu)
- Lam-Lamel (Menzel- Glose Polysine-25x 75x 1 mm & Surgipath Precleaned Adhesive 00210 White, Unilab Lamel 24x 50 mm)
- Serum Fizyolojik
- İnsulin enjektörü
- Batticon
- Enjektör
- Anestezik madde (Ketamin, Ksilazin-Rompun®)
- Carmubris (BİCNU, Bristol-Myers Squibb)
- Melatonin (Sigma M-5250)
- Biopac Student Lab Pro 3.70 programı ile uyumlu anal ısı probu (1992-2004 Microsoft Corp. Model MP35 Build. O3.02.04)

3.1.2.Deneysel Yöntem

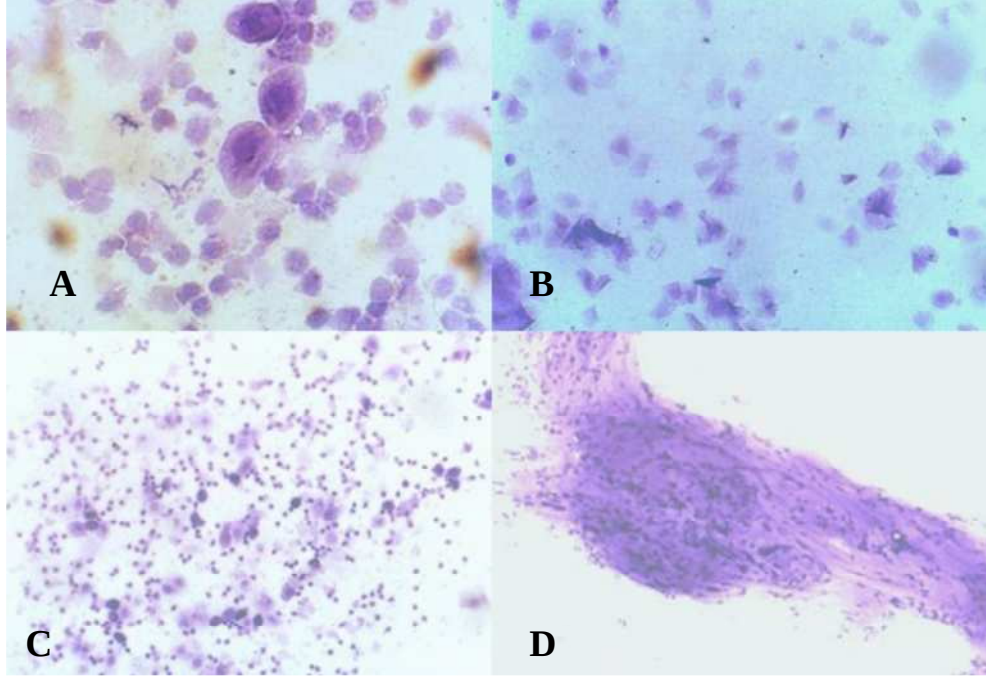
Bu çalışma, Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Hayvan Etik Kurulu'nun 2005-43 sayılı onayı ile laboratuvar hayvanları bakım ve koruma kılavuzu (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals-Institute of Laboratory Animal Resources Commission on Life Sciences National Research Council, USA) kriterleri dikkate alınarak gerçekleştirilmiştir.

Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Deney Hayvanları Yetiştirme Merkezi'nden temin edilen, seksüel olgunluğa erişmiş ağırlıkları 200-220 gr arasında değişen Wistar albino dişi sıçanlar, 22°C oda ısısında ve % 45-75 nemde, 12 saat aydınlık ve karanlık dönemlerle, serbest su ve gıda sağlanarak araştırmaya alındılar. Yem ve su günlük olarak değiştirildi. Çalışma süresince hayvanlar, kenarları sert plastik ve üstünde çelik ızgara bulunan deney grubuna göre işaretlenmiş kafeslerde (19x12x12 cm) tutuldu.

Estrus sikluslarının belirlenmesi için günlük vajinal smearlar alındı. Pamuklu çubuklarla alınan vajinal smearlar lama yayılarak alkolle tespit edilip, % 5'lik giemsa boyası ile boyanarak incelendi. Vajinal smearlar sıçanların estrus siklusunun dönemleri belirlenecek şekilde incelendi (**Şekil 13**).

- Proestrus dönemi (düzgün nükleuslu, tek veya gruplar oluşturmuş epitel hücreleri)
- Estrus dönemi (yüzlerce büyük kornifiye dejenere nükleuslu hücreler)
- Metestrus dönemi (birçok lökosit, çok az kornifiye hücre)
- Diestrus dönemi (ipliksi mukus ile karışık lökositler, bir kaç nükleuslu epitel hücresi) tanımlandı. Aynı dönem içinde olan hayvanlar beraber kafeslendi.

Proestrus dönemi gecesinde 5 dişiye 2 fertil erkek olacak şekilde sıçanlar çiftleştirildi. Çiftleşme sonrası, vajinal smearinde sperm hücreleri görülen sıçanlar gebe kabul edildi [202, 203].



Şekil 13. Sıçanlarda Estrus Siklusları (**A-** Proestrus **B-**Estrus **C-** Metestrus **D-** Diestrus)

3.1.2.1 Deney Grupları

Bu çalışmada 5 grup planlanmıştır.

1. İntakt kontrol grubu
2. Sham grubu (i.p serum fizyolojik uygulanan)
3. 30 µgr/100 gr ekzojen melatonin uygulanan grup
4. 20 mg/kg Carmustine uygulanan grup
5. 20 mg/kg Carmustine ve 30 µgr/100 gr ekzojen melatonin tedavisi uygulanan grup.

Deney gruplarında kullanılacak Melatonin® (*N*-acetyl-5-methoxytryptamine, 1 g, cat.no: M-5250, Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA), saf etanol

içerisinde çözüldükten sonra % 5 etanol derişimi sağlanacak şekilde serum fizyolojik ile sulandırılıp hazırlandı.



Şekil 14. Deneyde kullanılan Carmubris (Carmustine) ve Melatonin

Kontrollü gebe kalan sıçanlara, E15.gün DNA alkilleyici ajan olan Carmustine (BiCNU) uygulanıp kortikal displazi modeli oluşturuldu. Deneyssel gruplardan birisine de Carmustine uygulamasına ilaveten E15.günden doğuma kadar günlük maternal i.p melatonin uygulanmıştır (**Şekil 14**). 15.gün Carmustine uygulaması yapılan gruplarda ilacın bir yan etkisi olan yüksek ateşi gösterebilmek için anal prob kullanılarak bilgisayarda Biopac Student Lab Pro 3.70 (1992-2004) Microsoft Corp. Model MP35 Build. 03.02.04 programında data alınmıştır (**Şekil 15**).



Şekil 15. Carmustine uygulaması ve sonrasında anal ısı takibi

Melatonin- Kontrol grubuna E15. gününden itibaren her gün uygun dozda melatonin i.p olarak uygulanmıştır. Serum fizyolojik grubuna ait deneklere 15.gün tek doz diğer gruplarla aynı hacimde serum fizyolojik enjekte edilirken, intakt kontrol gruplarındaki gebe annelere hiç bir girişim ve uygulama yapılmamıştır.

Daha sonra ayrı kafeslere alınan sıçanların doğum yapması beklenmiştir. Doğum sonrası 30 dakika içinde Precia XB-220A model hassas terazide doğum ağırlıkları tartılıp not edilmiştir. Yeni doğan P0 sıçanlar letal dozda ketalar (0.15 mg/ 100gr) + Ksilazin (Rompun®) (0.02 ml/100gr) ile anestezi altında intrakardiyak perfüzyon uygulanarak fiksasyon sağlanmıştır.

3.1.3. Mikroskopik Gereç

- Cacodylate (Sigma C-0250)
- Tri-sodyum Sitrat (Carlo Erba 368057)
- Toz Paraformaldehit (Merck 1.04.005.1000)
- Glutaraldehit (% 25'lik)(Merck 8.20603.1000)

3.1.3.1.Tamponlar

1) 0.2 M Cacodylate tamponu

- 9,6 gr Cacodylate
- 150 cc distile su [226].

Dimetilarсенik asit türevidir, dikkatli kullanılmalıdır.

2) **Sitrat tampon solüsyonu:** Formalin ve diğer aldehitli fiksatifler antijenik bölgedeki çapraz bağları maskelerler bunun sonucunda immunohistokimyasal boyamalarda zayıf veya yalancı negatif sonuçlar alınması söz konusu olabilir. Bu çapraz bağlardan kurtulmanın ve antijenlerin açığa çıkmasının bir yolu da sitrat tamponu ile yüksek ısıda muamele etmektir. Sodyum Sitrat Tamponu (10mM Sodyum Sitrat, % 0.05 Tween 20, pH 6.0):

Tri-sodyum Sitrat (dihydrate) ----- 2.94 g

Distile Su ----- 1000 ml

Tri-sodyum sitrat distile suda çözülür. Solüsyonun pH 6.0 olarak 1 Molar HCl ile ayarladıktan sonra üzerine 0.5 ml Tween 20 ilave edilir. Final solüsyonu +4 °C de uzun süre saklanır.

3) PBS (Tuzlu fosfat tamponu) yıkama solüsyonu

NaH₂PO₄.H₂O -----4.8 gr

NaCl -----7.8 gr

Distile Su ----- 1000 ml (pH:7.2)

3.1.3.2. Fiksatif maddeler

(0.1M) Cacodylate tamponlu % 2'lik glutaraldehide ve % 2'lik paraformaldehide solüsyonu.

- 8 cc % 25'lik glutaraldehit
- 25 cc % 8'lik paraformaldehit
- 17 cc distile su
- 50 cc 0.2M'lık cacodylate tamponu [195, 226].

% 8'lik Paraformaldehit

- 40 gr Paraformaldehit (Merck, 1.04.005.1000)
- 500 cc distile suda çözülür. 58-60 °C sıcaklıkta 30 dakika karıştırılarak çözünmesi kolaylaştırılır. Soğutulur, süzülür ve pH'ı 7,2-7,4 arasına getirilir.

3.1.4. Mikroskopik Yöntem

3.1.4.1. Perfüzyon

- Dissosiyatif anestezi altında deri, derialtı, fasia kaldırıldı.
- Processus xphoideus belirlendi.
- Processus xphoideus yukarı kaldırılıp, diafragma belirlendi.
- Diafragma toraksa girmek için disseke edildi.
- Toraksa girip, kalbe ulaşıldı.
- Sol ventrikül içine apeksin yanından branül yardımıyla girildi.
- Hazırlanan özel fiksatifler dolaşım sisteminin 1cc/1sn/1gr'de gidecek şekilde perfüze edildi.
- 1-2 sn sonra sağ atrium enjektör ucuyla delinerek dolaşım kanının dışarı çıkması sağlandı.



Şekil 16. Doğum ağırlığı ölçülmesi, anestezi altında perfüzyon ve disseksiyon

3.1.4.2. Disseksiyon

İntrakardiyak perfüzyon yöntemi ile fikse edilen P0 yeni doğan sıçanların cerebrum ve cerebellumlarına ince pens yardımıyla ulaşıldı (**Şekil 16**). Basis craniumdan blok halinde ayrılan MSS bölümleri aynı fiksatifte 24 saat bekletildi (immersiyon). Medulla spinalise kadar olan bölümden disseksiyon mikroskopunda cerebellumları ayrıldı. Cerebellum orta hattan ayrılarak küçültülüp, ışık ve elektron mikroskopik takibe alındı.

3.1.5. Işık Mikroskopik Gereç

- Etanol (Merck 1.00886.2500)
- Ksilol (Merck 1.08681.2500)
- Parafin (Surgipath 1F-200, Mavi boncuk)

- Hematoksilen Solüsyonu (Merck 1.05174.2500)
- Mercuric oksit (Merck 1.04465.0100)
- HCl (Merck 1.109060.2500)
- Amonyum solüsyonu (% 25'lik) (Merck 1.05432.2500)
- Eozin
- Toluidin Blue (Sigma T3260-25gr)
- Boraks (Merck Art.6303)

3.1.5. Işık Mikroskopik Yöntem

3.1.5.1.Takip ve Gömme

1. Parçalar 24 saat fiksatifte bekletildi.
2. 24 saat aynı tamponda yıkanıp bekletildi.
3. 2 saat % 80 Etanolde
4. 3 saat % 95 Etanol I'de
5. 15 saat % 95 Etanol II'de
6. 2 saat % 100 Etanol I'de
7. 2 saat % 100 Etanol II'de
8. 2 saat % 100 Etanol III'de

bekletilerek takip şemasına uyuldu.

Alkolden çıkarılan parçalar oda ısısında açık havada iyice kurutuldu.

9.10 dakika Ksilol I'de

10.10 dakika Ksilol II'de

11. Ksilol III'de (Parçalar şeffaflaşma kritik noktasında çıkarıldı.)

12. 58-60°C'lik etüvde erimiş parafin içerisine alınan parçalar 1 gece bekletilirler. Ertesi gün etüvden çıkarılan parçalar mavi boncuk parafin eriyiğine gömülerek bloklandı.

3.1.5.2. Kesit Alma

Işık mikroskopik kesitler için Leica RM 2145 model mikrotomda 3µ luk kesitler 45°C'lik su banyosuna alındı. Kesitlerin lama iyice yapıştırılması ve parafin uzaklaştırma işlemlerinde mikrodalga fırın (Arçelik MD554) kullanıldı. Tüm gruplardan elde edilen histolojik preparatlarda uygun histokimyasal ve immunohistokimyasal boyamalar gerçekleştirildi. Toluidin ile boyanan kesitler ise epon bloklardan Reichert, Austria Nr.313864 ultramikrotomda 1 µ kalınlıkta alındı. (Bakınız sayfa 100)

3.1.5.3. Işık Mikroskopik Boyama

3.1.5.3.1. Histokimyasal Boyama

3.1.5.3.1.1 Histokimyasal Gereç

- Hematoksilen Solüsyonu (Merck 1.05174.2500)
- Mercuric oksit (Merck 1.04465.0100)
- Eozin
- Toluidin Blue (Sigma T3260-25gr)
- Boraks (Merck Art.6303)
- Işık mikroskopu (Olympus BX-51 light microscope)
- Dijital kamera (Olympus C-5050)

3.1.5.3.1.2 Histokimyasal Yöntem

3.1.5.3.1.2.1. H&E Boyama

Solüsyonlar:

Hematoksilen, kristal	5 gr
% 95 alkol	50 cc
Amonyum	100 gr
Mercuric oksit	2.5 gr
Asid Alkol solusyonu	
% 70 alkol	1000 cc
HCl	10 cc
Amonyaklı Su	
Distile su	1000 cc
Amonyak	1-2 cc
Eosin Solüsyonu	
Eozin Y, % 3 sudaki solüsyonu	100 cc
% 95 alkol	125 cc
Distile su	375 cc

Boyama Tekniği

Preparatlar aşağıdaki deparafinize ve boyama basamaklarından geçirilir

- 1.Ksilol I 10 dakika
2. Ksilol II 10 dakika
3. Ksilol III 10 dakika
4. İyice dışarıda kuruduktan sonra alkole geçirilir.
5. % 100 Alkol I 2 dakika

6. % 100 Alkol II 2 dakika
7. % 95 Alkol 2 dakika
8. % 80 Alkol 2 dakika (veya daha uzun süre)
9. Distile su 5 dakika (preparatlar iyice süzülecek)
10. Hematoksilen 2,5 dakika (boya her kullanışta süzülecek)
11. Akar su 5 dakika
12. Acid alkol Pembe renk olana kadar
13. Akar suda Daldır çıkar
14. Amonyaklı su Mor renk olana kadar
15. Akar su Daldır çıkar
16. Distile su 5 dakika (preparatlar kurutulur)
17. Eozin 2,5 dakika
18. % 95 Alkol 2,5 dakika
19. % 100 Alkol I 2,5 dakika
20. % 100 Alkol II 2 dakika
21. Dışarıda iyice kurut
22. Ksilol I 10 dakika
23. Ksilol II 10 dakika
24. Ksilol III 10 dakika

Boyalı preparatlar entellan damlatılarak kapatılır.



Şekil 17. Laboratuarda kullanılan teknik, boya ekipmanları ve fotoğraflama işlemi gerçekleştirilen mikroskopik görüntüleme sistemi.

3.1.5.3.1.2.2. Toluidin Blue Boyama

Stok solüsyonu

Toluidin Blue.....0,1 gr

Boraks.....1 gr

Distile su.....50 cc

Bu karışım en az bir gün bekletilir.

Çalışma solüsyonu

Stok solüsyondan bir şalelik hacim olacak şekilde distile su ilave edilerek 1:1 seyreltilir. Preparatlar 60 °C’de sıcak çalışma solüsyonunda 1-2 dakikada boyanır. Akarsuya alınan parçalar kurutularak kapatılır [195].

3.1.5.3.2.İmmunohistokimyasal Boyama

3.1.5.3.2.1. İmmünohistokimyasal Gereç

- Mouse Anti-GFAP (GA5) (Labvision Co.-Neomarkers Cat# RB-087-R7
(7 ml- Ready to use)
- Rabbit Anti-Synaptophysin (Labvision Co.-Neomarkers Cat# RB-1461-R7
(7 ml Ready to use)
- Anti TGF- β 1 (Promega Cat#G1221)
- Anti-Nestin (Chemicon Int. Ltd., Harrow, UK Cat#MAB353)
- Zymed Histostain Plus (Biotinylated Horse Anti-Mouse IgG (H+L), HRP-Streptavidin, Blocking Solution Ref/Cat No:859643, San Francisco California, USA).
- Promega TUNEL Systems (Cat. # G7130 or G7360).
- Mayer's hematoxylin solüsyonu (Dakocytomation Code no: SL030 Lot: 063190)
- % 30'luk Peroksidaz solüsyonu (Carlo Erba Code No:412072005)
- DAB (3,3-diaminobenzidine) peroksidaz solüsyonu (Zymed Histostain Plus Ref/Cat No:859643 San Francisco California, USA).
- Super Pap-Pen (Part No: IM3580 immunotech, Beckman Coulter, France)



Şekil 18. Kullanılan immunohistokimyasal markerlar

3.1.5.3.2.2. İmmünohistokimyasal Yöntem

3.5.3.2.2.1. GFAP boyama protokolü

Kesitler aşağıdaki basamaklardan geçirilerek boyama işlemi tamamlanır.

Buna göre:

1. Ksilol içinde mikrodalga fırında 90 watt'da 1 dakika işlem görüp deparafinize edilen kesitler distile suya alınır.
2. Preparatlar içinde sitrat tamponu (pH: 6.0) bulunan kap içinde mikrodalga fırında 5 dakika 90 watt-15 dakika 360 watt ta muamele edilir. Bu özel kaplar 20 dakika sonunda su banyosuna alınır, oda sıcaklığına ulaşması için bekleme 20 dakika (Epitopların açığa çıkarılması).
3. Yıkama solüsyonunda 2x2 dakika.
4. Serum Bloklama: Kesitlerin immunoglobulinin nonspesifik taşınmasını engellemek için normal horse serum bloklama solüsyonunda 30 dakika.

5.Primer antibody: Kesitler 1:100 dilüsyonda mouse Anti-GFAP (GA5) (Labvision Co.-Neomarkers Cat# RB-087-R7 7 ml Ready to use) primer antikoru ile tüm gece inkübasyon.

6.Yıkama tamponunda 2x 2 dakika

7.Endojen peroksidaz aktivitesini bloklamak için kesitler peroksidaz bloklama solüsyonunda 10 dakika

8.Yıkama tamponunda 3x 2 dakika

9.Sekonder antikör olan Biotinle konjuge Horse anti-Mouse IgG ile kesitler 30 dakika oda sıcaklığında inkübasyon.

10. Yıkama tamponunda 3x 2 dakika

11. Görünür hale getirme: HRP-Streptavidin ile 30 dakika

12. Yıkama tamponunda 3x 2 dakika.

13. DAB (3,3-diaminobenzidine) peroksidaz substrat solüsyonu ile 5-10 dakika (Mikroskopik kontrollü).

14. Distile su ile 2x 2 yıkama.

15. Mayer's hematoxylin solüsyonu ile boyama (Hücre sayımı ve oryantasyon için).

16. Akar suda 5 dakika.

17. Dehidratasyon için % 95 alkolde 2 dakika, % 100 alkolde 2x 3 dakika.

18. Ksilolde 2x 3 dakika.

Entellan ile lamel kapatılıp, mikroskopik inceleme yapılır.

3.5.3.2.2.2. Synaptophysin Boyama Protokolü

Kesitler aşağıdaki basamaklardan geçirilerek boyama işlemi tamamlanır.

Buna göre:

1- Ksilol içinde mikrodalga fırında 90 watt'da 1 dakika işlem görüp deparafinize edilen kesitler distile suya alınır.

2- Preparatlar, içinde sitrat tamponu (pH: 6.0) bulunan kap içinde mikrodalga fırında 5 dakika 90 watt-15 dakika 360 watt ta muamele edilir. Bu özel kaplar 20 dakika sonunda su banyosuna alınır oda sıcaklığına ulaşması için bekleme 20 dakika.

3.Yıkama solüsyonunda 2x 2 dakika.

4 Serum Bloklama: Kesitler immunoglobulinin non-spesifik bağlanması engellenmesi için normal horse serum bloklama solüsyonunda oda sıcaklığında 30 dakika.

5 Rabbit Anti-Synaptophysin (Labvision Co.-Neomarkers Cat# RB-1461-R7 -7 ml Ready to use) primer antikoru ile tüm gece inkübasyon.

6.Yıkama tamponunda 2x 2 dakika.

7.Endojen peroksidaz aktivitesini bloklamak için kesitler peroksidaz bloklama solüsyonunda 10 dakika.

8- Yıkama tamponunda 3x 2 dakika.

9-Sekonder antikor olan Biyotinle konjuge Horse anti-Mouse IgG ile kesitler 30 dakika oda sıcaklığında inkübasyon.

10-Yıkama tamponunda 3x 2 dakika.

11-Görünür hale getirme: Kesitler HRP-Streptavidin ile oda sıcaklığında 30 dakika.

12-Yıkama tamponunda 3x 2 dakika.

13- DAB (3, 3-diaminobenzidine) peroksidaz substrate solüsyonu ile 5- 10 dakika (Mikroskopik kontrollü).

14-Distile su 2x 2 dakika.

15-Dokuyu belirlemek için Mayer's hematoxylin solüsyonu ile boyama.

15. Akarsuda 5 dakika.

16-Dehidratasyon için % 95 alkolde 2 dakika, % 100 alkolde 2x 3 dakika.

17-Kesitlerin parlak görünmesi için ksilolde 2x 3 dakika.

Entellan ile lamel kapatılır, mikroskopik inceleme yapılır.

3.5.3.2.2.3. Nestin Boyama Protokolü

1. Ksilol içinde mikrodalga fırında 90 watt'da 1 dakika işlem görüp deparafinize edilen kesitler distile suya alınır.

2. Preparatlar içinde sitrat tamponu (pH: 6.0) bulunan kap içinde mikrodalga fırında 5 dakika 90 watt-15 dakika 360 watt ta muamele edilir. Bu özel kaplar 20 dakika sonunda su banyosuna alınır oda sıcaklığına ulaşması için bekleme 20 dakika (Epitopların açığa çıkarılması).

3. Yıkama solüsyonunda 2x 2 dakika.

4. Serum Bloklama: Kesitler immunoglobulinin non-spesifik bağlanmasının engellenmesi için normal horse serum bloklama solüsyonunda oda sıcaklığında 30 dakika.

5. % 0.5 Triton X içeren 0,2 M Tris-HCl tamponunda 3x 2 dakika
 6. 1:500 diluasyonda Anti-Nestin (Chemicon Int. Ltd., Harrow, UK Cat#MAB353) primer antikoru tüm gece inkübasyon.
 7. Yıkama tamponunda 3x 2 dakika.
 8. Rabbit anti-İgG ile (1:200) 45 dakika inkübasyon.
 9. Sekonder antikor olan Biotinle konjuge Horse anti-Mouse IgG ile kesitler 30 dakika oda sıcaklığında inkübasyon.
 10. Yıkama tamponunda 3x 2 dakika.
 11. Kesitler HRP-Streptavidin (1:100) ile oda sıcaklığında 30 dakika.
 12. Yıkama tamponunda 3x2 dakika.
 13. DAB (3, 3-diaminobenzidine) peroksidaz substrate solüsyonu ile 5-10 dakika (reaksiyon mikroskopik kontrollü).
 14. Mayer's hematoxylin solüsyonu ile boyama (Hücre sayımı ve oryantasyon için).
 15. Akarsuda 5 dakika.
 16. Dehidrasyon için % 95 alkolde 2 dakika, % 100 alkolde 2x 3 dakika.
 17. Kesitlerin parlak görünmesi için ksilolde 2x 3 dakika.
- Entellan ile lamel kapatılır, mikroskopik inceleme yapılır.

3.5.3.2.2.4. TGF- β 1 Boyama Protokolü

Kesitler aşağıdaki basamaklardan geçirilerek boyama işlemi tamamlanır.

Buna göre:

1.Ksilol içinde mikrodalga fırında 90 watt'da 1 dakika işlem görüp deparafinize edilen kesitler distile suya alınır.

2.Preparatlar içinde sitrat tamponu (pH: 6.0) bulunan kap içinde mikrodalga fırında 5 dakika 90 watt-15 dakika 360 watt ta muamele edilir. Bu özel kaplar 20 dakika sonunda su banyosuna alınır, oda sıcaklığına ulaşması için bekleme 20 dakika (Epitopların açığa çıkarılması).

3.Yıkama solüsyonunda 2x 2 dakika.

4.Serum Bloklama: Kesitler immunoglobulinin non-spesifik bağlanmasının engellenmesi için normal horse serum bloklama solüsyonunda 30 dakika inkübasyon.

5. 1:200 diluasyonda Anti-TGF β 1 (Promega Cat#G1221) primer antikoru ile tüm gece inkübasyon.

6.Yıkama tamponunda 2x 2 dakika.

7.Endojen peroksidaz aktivitesini bloklamak için kesitler peroksidaz bloklama solüsyonunda 10 dakika.

8.Yıkama tamponunda 3x 2 dakika.

9.Sekonder antikor olan Biyotinle konjuge Horse anti-Mouse IgG ile kesitler 30 dakika oda sıcaklığında inkübasyon.

10. Yıkama tamponunda 3x 2 dakika.

11. Kesitler HRP-Streptavidin (1:100) ile 30 dakika oda sıcaklığında.

12. Yıkama tamponunda 3x 2 dakika.

13. DAB (3, 3- diaminobenzidine) peroksidaz substrat solüsyonu ile 5- 10 dakika (mikroskopik kontrollü).

14. Yapıları görünür hale getirmek için Mayer's hematoxylin solusyonu ile boyama.

15. Akarsuda 5 dakika.

16. Dehidratasyon için % 95 alkolde 2 dakika, % 100 alkolde 2x 3 dakika.

17. Kesitlerin parlak görünmesi için ksilolde 2x 3 dakika.

Entellan ile lamel kapatılır, mikroskopik inceleme yapılır.

3.5.3.2.5. TUNEL Boyama Protokolü

Promega DeadEnd™ Colorimetric TUNEL Systems (Cat. # G7130 - G7360)

kiti kullanılarak yapılmıştır. Kit içerisinde;

- Equilibration Buffer ve Biotinylated Nucleotide karışımı
- Terminal Deoxynucleotidyl Transferase enzimi
- SSC (Sodyum sitrat, NaCl karışımı)
- Proteinase K
- Streptavidin HRP (0.5mg/ml)
- DAB 20X kromojen
- DAB Substrat Buffer
- Hidrojen Peroksit
- Plastik preparat örtücü bulunur.



Şekil 19. TUNEL kiti ve içeriği

Protokol

1. Ksilol içinde mikrodalga fırında 90 watt’da 1 dakika işlem görüp deparafinize edilir.
2. 95° alkol- 5 dakika
3. 80° alkol- 3 dakika
4. 70° alkol- 3 dakika
5. 60° alkol- 3 dakika
6. Serum fizyolojik içinde oda sıcaklığında 5 dakika
7. PBS ile yıkama (3x 5 dakika)
8. Fiksasyon- % 4’lük paraformaldehit+ PBS- 15 dakika
9. Yıkama- PBS (2x 5 dakika)
10. 20 µg/ml Proteinaz K (Stok solüsyondan 10 µg/ml P.K den 1:500 dilue). Her kesit üzerine 100 µl konularak 10 dakika inkubasyon
11. PBS ile yıkama (2x 5 dakika)
12. % 4 Paraformaldehit 5 dakika
13. PBS ile yıkama (2x 5 dakika)
14. Oda sıcaklığında 100 µl equilibration buffer içinde 5 dakika inkübasyon

15. Tdt hazırlama: Her kesit üzerine Equilibration buffer(EB) -----98 µl

Biotinlenmiş Nükleotid mix-----1 µl

Enzim-----1 µl

+

100 µl

16. .Her kesit üzerine 100 µl Tdt koyulup üzerleri plastik örtü ile örtülüp bekletme

1 saat (Negatif kontrol:Tdt enzim olmayan 98 µl EB+1 µl BNM koyulur).

17. Kesitlere 20X SCC'nin 1:10 oranında distile su ile dilue edilerek damlatılması

18. PBS (5x 2 dakika)

19. % 0,3 H₂O₂ 3,5 dakika.

20. PBS (5x 2 dakika)

21. Kesitler 1/500 oranında Streptavidin-HRP/PBS diluasyonunda 30 dakika

(oda sıcaklığında)

22. Her kesitin üzerine DAB (3, 3- diaminobenzidine) 100 µl koyulup kahverengi

olana kadar 10 dakika (Mikroskopik kontrollü)

23. Distile su ile 3x 2 yıkama

24. Meyer hematoksilen ile 2 dakika

25. Distile su ile 3x 2 yıkama

26. Entellan ile kapatılır.

3.1.6. Elektron Mikroskopik Gereç

- Osmium tetroksit- OsO₄ (Sigma 05500)
- Propilenoksit (Merck 8.07027.1000)
- Epon 812 (Fluka 45345)
- DDSA (Fluka 45346)
- MNA (Fluka 45347)
- DMP 30 (Fluka 45348)
- Kurşun nitrat (Merck Art. 7396)
- Uranil asetat (Electron Microscopy Sciences 22400)
- NaOH (Merck 1.06462.5000)
- BEEM 036 kapsül
- 3,05 mm çaplı G 200 Gilder grid
- Etüv (Heraeus FB420)
- Reichert, Austria Nr.313864 ultramikrotom
- Jeol JM-1011 Transmisyon elektron mikroskop

3.1.7.Elektron Mikroskopik Yöntem

3.1.7.1. Fiksasyon

Ortak mikroskopik yöntemin sonunda yapılan disseksiyondan sonra elektron mikroskopik parçalar postfiksasyon öncesi tampona alınıp bir gece bekletildi (Bakınız Sayfa 80). Elektron mikroskopi takip tekniğinde lipidlerin tespiti için gerekli osmium tetroksit ile postfiksasyon işlemi yeni doğan cerebellum dokusuna uygulanmıştır.

Osmium Tetroksit (Postfiksasyon için)

Stok solüsyon hazırlanması için kullanılacak şişenin kahverengi olması, geniş ağza sahip olması, camdan yapılı kapağının şişe ağzına iyice uyması ve şişenin özel olarak önceden iyi bir şekilde temizlenmesi gerekir. Önceden temizlenmiş ve bu amaç için kullanılacak 100 cc'lik geniş ağızlı ve cam kapaklı şişe bir gece süre ile saf sülfürik aside (H_2SO_4) bırakılır. Pens yardımı ile asitten alınan şişe akarsu ve takiben distile suda iyice yıkanır. Bu şişe içine 50 cc. distile su konduktan sonra osmiyum tetroksidin 1 gr.lık ampülü bu şişe içinde kırılır. Osmium tetroksit ampulünün de daha önceden iyice temizlenmesi gerekir. Bu amaçla önce ampulün etiketi çıkarılır ve bir saat saf sülfürik asitte bekletilir. Sonra defalarca distile sudan geçirilir daha sonra ampulün ucuna yakın yerden ampul testeresi ile halka şeklinde çizilir tekrar distile sudan geçirilir. Daha sonra ucu aleve tutulmuş pens yardımıyla ampul tutulur ve çizilen uç bir benzen alevinde ısıtıldıktan sonra 50 cc. distile su bulunan şişe içine atılır. Sıcak ampul soğuk suyla temas edince testere ile çizilmiş yerinden parçalanır. Serbest kalan osmiyum tetroksit kristalleri oda ısısında erimeye bırakılır. Osmium tetroksit suda güç eridiğinden eriğin kullanılmadan bir gün önce hazırlanması gerekir. Bu şekilde hazırlanmış % 2'lik tetroksit eriği çok açık sarı renkte ve berrak görünüşlüdür [113].

- Cacodylate tamponunda bulunan elektron mikroskopik parçalar temiz tüpe aktarıldı.
- Post fiksasyon için tüplere 1.1 oranında + Cacodylate tamponlu osmium tetroksit (OsO_4) eklenip (1-1,5 saat) fikse olması sağlandı.
- Parçalar Cacodylate tamponu ile 3x5 dakika yıkanıp dehidratasyon işlemine geçildi.

3.1.7.2. Dehidratasyon

- % 50 Alkol (15 dakika)
- % 50 Alkol (15 dakika)
- % 70 Alkol (25 dakika)
- % 95 Alkol (25 dakika)
- % 100 Alkol (30 dakika)
- % 100 Alkol (15 dakika) serilerden geçirilir.

Parçaların dehidrasyonu sağlanır.

- 1:1 oranında % 100 Alkol- Propilenoksit (30 dakika)
- Saf propilenoksit (30 dakika)
- Saf propilenoksit (30 dakika) bekletilir, temiz tüplere alınır
- 2:1 oranında propilenoksit + Epon karışımına konur (60 dakika) .
- 1:2 oranında propilenoksit + Epon karışımına konur (60 dakika) .
- DMP-30'suz Epon karışımına alınarak 1 gece (parçaların dibe çökene kadar) buzdolabında 4 °C de bekletildi.

3.1.7.3. Gömme

- % 1.5-2 oranında DMP-30 içeren epon içerisinde BEEM 036 pyramidal kapsüllere gömüldü.
- 37 °C etüvde 24 saat tutuldu.
- Etüv ısısı 45°C ye yükseltildi (24 saat) .
- Etüv ısısı 60°C ye yükseltildi (24 saat) .
- Etüvden alınan parçaların tamamen sertleşmesi dolayısıyla kesite hazırlanması için oda ısısında 10 gün beklemeleri gerekmektedir.

3.1.7.4. Kesit Alma

- Reichert, Austria Nr.313864 ultramikrotom aracılığı ile elektron mikroskobu için yarı ince kesitler alındı. Toluidin boyalı kesit görüntülere göre cerebellum korteks katmanlarını içerecek biçimde parçaların kesit yüzeyleri küçültüldü ve ince kesitler alındı.
- Kesitler 3,05 mm çaplı Gilder grids G-200 bakır gridler üzerine yerleştirildi.

3.1.7.5. Boyama

Solüsyonlar

Uranil Asetat Hazırlanması;

- Uranil Asetat 3,75 gr.
- Distile su.....50 cc.

250 ml'lik erlenmayer kabına 50 cc.kaynatılmış-soğutulmuş distilw su konur 3,75 gr. uranil asetat konur ve 15 dakika karıştırılır. Erlenmayer parafilm ile kapatılır.En az 1-2 saat buzdolabında bekletilir. Stok solüsyonundan 10 ml. Patör pipetiyle, 15 ml.lik konik santrifüj tüpüne 5 ml. uranil asetat, 5 ml. etanol konur. 1800 devirde + 4°C de 20 dakika soğuk santrifüj yapılır. Kesitlerin uranil asetat ile boyanması: Santrifüj edilen solüsyondan boya kaplarına yetecek miktarda konarak içerisine kesitler temas edecek şekilde üzeri kapatılır (Parlak yüzey yukarı, mat yüzey aşağı konur. 9,5 dakika bekletildikten sonra kesitler pens yardımıyla çıkarılıp distile su ile yıkanır. Petri kutularına kurumaya bırakılır.

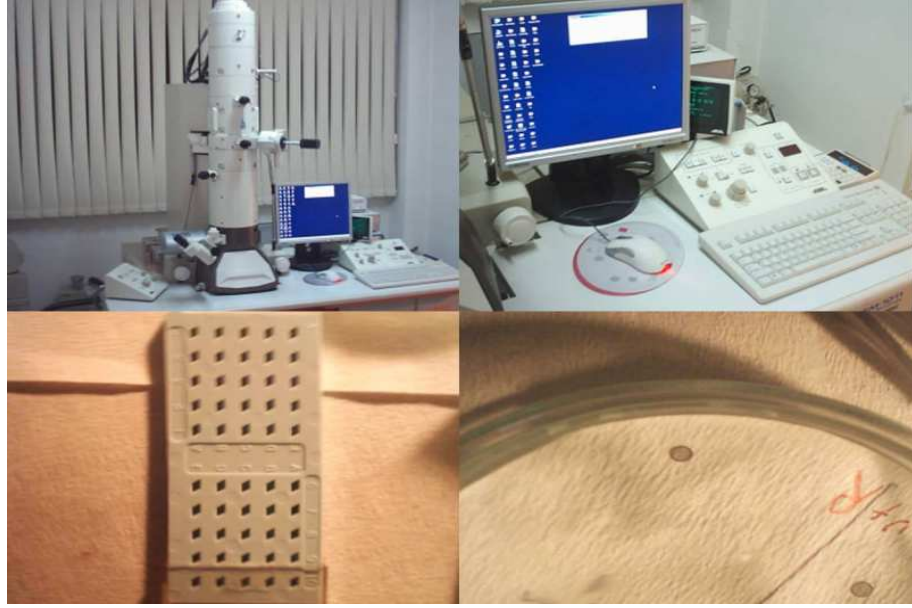
Kurşun Boyası Hazırlanması;

- Kurşun nitrat ($Pb(NO_3)_2$) 1,33 gr.

- Sodyum sitrat $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 5H_2O$ 2,137 gr.

50 ml. şişeye 30 ml. kaynatılmış distile su konur. Kurşun nitrat + sodyum sitrat ikisi bir arada karıştırılır. Üzerine 8 ml. 1 N NaOH eklenir. Toplam hacim 50 ml. distile suyla tamamlanarak stok solüsyonu hazırlanır. Stok solüsyonu 10 ml. pipetle 15 ml.'lik santrifüj tüpüne 10 ml. saf kurşun solüsyonu konur. Soğutmalı santrifüjde 1800 devirde 20 dakika santrifüj yapılır. Kesitlerin kurşun ile boyanması; Santrifüj yapılan solüsyon, kesitleri boyamaya hazırdır. Dişçi mumu üzerine bırakılır. Dişçi mumunun bir kenarına NaOH'dan bir parça konulur ve 20 dakika bekletilir. Kesitler sonra tridistile su ile yıkanır. Kurumaya bırakılır.

- Gridler uranil acetate ile boyama için mat yüz solüsyona temas edecek şekilde ters kapatıldı. (20 dakika bekletildi.)
- Sonra borulu polietilen yıkama şişesinde saf su ile yıkama yapıldı.
- Gridler kuruduktan sonra ikinci boyama olan kurşun sitrat boyamasına geçildi. Önceden hazırlanmış olan 4mm'lik dişçi mumlu petri kutularına grid sayısı kadar damlatılan kurşun sitrat boyası üzerine gridler mat tarafı solüsyona temas edecek şekilde yerleştirildi. Havadaki karbondioksiti alması için hazırlanmış olan petri kutusunun bir kenarına sodyum hidroksit (NaOH) konuldu.
- 20 dakika sonunda gridler boyadan çıkarılıp yıkandı. Bütün bu işlemlerden sonra gridler Jeol Jem-1011 elektron mikroskobunda incelenip değerlendirildi ve gerekli resimler değişik büyültmelerde çekildi.



Şekil 20. Jeol Jem-1011 Transmisyon Elektron Mikroskobu, kullanılan gridler ve grid kutusu

3.1.8 Karşılaştırmalı Işık ve Elektron Mikroskopik Preparasyon Protokolü

İnceleme	Işık Mikroskopi	Elektron Mikroskopi
Fiksasyon yöntemi	• Perfüzyon • İmmersiyon	• Perfüzyon • İmmersiyon
Doku Hacmi	1 cm ³	1 mm ³
Fiksatif	(0.1M) cacodylate tamponlu % 2'lik glutaraldehit ve % 2'lik paraformaldehit solüsyonu	(0.1M) cacodylate tamponlu % 2'lik glutaraldehit ve % 2'lik paraformaldehit solüsyonu
Postfiksatif	Yok	Osmium tetroksit
Dehidrasyon	Dereceli alkol	Dereceli alkol
Şeffaflandırma	Ksilol	Propilen dioksit
Gömme	Mavi parafin	Epon 812
Kesit kalınlığı	Yarı ince Kesitler : 1µ Parafin Kesitler: 3µ	60-90 nm
Boyalar	H&E, Toluidin Blue, Nestin, TGF- β1, TUNEL, Synaptophysin, GFAP	Kurşun sitrat Uranil asetat

3.1.9. Biyokimyasal Analiz ve Yöntem

Çalışmanın biyokimyasal analizi, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'nda yapılmıştır.

Cerebellum biyopsilerinin biyokimyasal analizi için, fiksatif kullanılmamış ve sıvı azot içinde dondurulmuş taze dokular öncelikle homojenize edildi. Bunun için, hassas terazi ile tartılan 100 mg donmuş cerebellum örneği, kuru buz üzerinde parçalara ayrıldı. Daha sonra fosfat tamponu (1:10, w/v) içinde, manuel bir cam homojenizatör kullanılarak yaklaşık 5 dakika homojenize edildikten sonra büyük atıkların ayıklanması için yaklaşık 5 dakika santrifüj uygulandı. Bu işlemlerin ardından, üst faz homojenatlarda MDA ve SOD analizleri yapıldı.

3.1.9.1 MDA Ölçümü

Homojenatlardaki MDA düzeyinin belirlenmesinde, spektrofotometrik olarak tiyobarbitürik asid reaktif maddelerinin varlığının ölçülmesi yöntemi kullanılmıştır [227]. Homojenat üzerine TBA eklendikten sonra 100°C'de 20 dakika kaynatılarak 2000 rpm 10 dakika santrifüjlendikten sonra süpernatantta 532 nm dalga boyunda kolorimetrik ölçüm yapıldı. 1,1,3,3-Tetraetoksipropen ile hazırlanan standart grafikten nmol/mL MDA hesaplandı. Sonuçlar nmol/g doku olarak ifade edildi.

3.1.9.2 SOD Ölçümü

Homojenatlar fosfat tampon ile 1/100 dilue edilerek pH:10.2'de epinefrinin adenokroma otooksidasyonu temeline dayalı kolorimetrik yöntem ile SOD düzeyleri hesaplandı [205]. 2 ml karbonat tampon üzerine örnek ve % 0,55 epinefrin çözeltisinden eklenerek absorban artış 15 saniye ara ile 3 dakika

boyunca 480 nm dalga boyunda izlendi. Enzimin epinefrinin adenokroma otooksidasyonunu inhibe etme yüzdesi hesaplandıktan sonra standard grafikten elde edilen veriler U/g protein olarak ifade edildi.

3.1.10 İstatiksel Değerlendirme

Çalışmada elde edilen veriler ortalama±standart hata olarak sunuldu. Fetal ağırlıklar, cerebellum da Nestin (+), TUNEL (+) hücre sayısı ve EGL kalınlığı ile MDA ve SOD düzeyleri açısından gruplararası farkın anlamlılığının analizinde bağımsız örnekler için nonparametrik bir test olan Kruskal Wallis testi kullanıldı. Anlamlılık eşiği 0.05 olarak değerlendirildi. P değeri 0.05'in altında gözleendiğinde posthoc analiz uygulandı ve hangi iki grup arasında anlamlı farklılık olduğu Mann Whitney U testiyle analiz edildi. Carmustine öncesi ve sonrası rektal sıcaklıklar arasındaki farkın test edilmesinde de direkt Mann-Whitney U testi uygulandı. Tüm analizler SPSS 11.01 programı kullanılarak yapılmıştır.

4.BÖLÜM III

4.1 BULGULAR

4.1.1. MORFOLOJİK BULGULAR

4.1.1.1 Makroskobik Bulgular

Carmustine uygulamasına bağlı olarak anne sıçanlarda klinik gözlemler

Tablo 1 de gösterilmiştir.

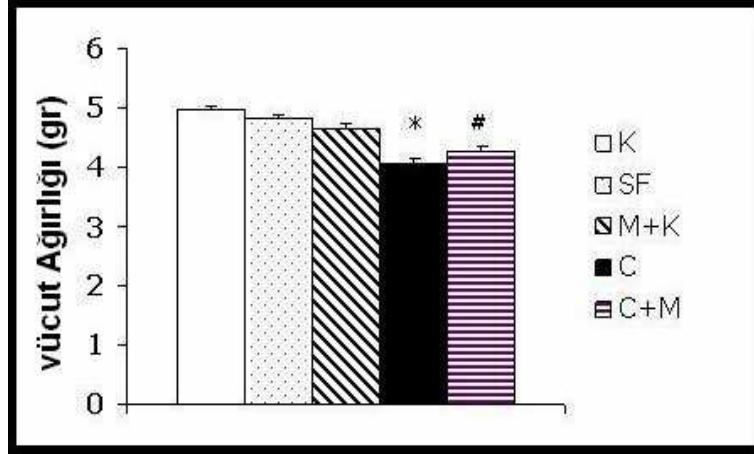
Tablo 1. Anne sıçanların klinik gözlemi.

	Kontrol grubu	SF grubu	Melatonin Kontrol grubu	Carmustine grubu	Carmustine +Melatonin grubu
Ateş	-	-	-	+	+
Hareketlilik	N	N	N	Azalma	Azalma
Tüylerde dökülme	-	-	-	++	+
Enjeksiyon yerinde yanma	-	-	+	+	+
Konjunktival kızarıklık	-	-	-	+	+
Ortalama gebelik süresi (/gün) ortalama	21	21	20	25	23

Tablo 2. Carmustine (20 mg/kg dozunda) uygulamasının erişkin anne sıçanda rektal yolla ölçülen vücut sıcaklığına etkisi. N:10

Carmustine'den önce		Carmustine'den sonra	
30. dakika	15. dakika	15. dakika	30. dakika
37,31±0,21	37,33±0,18	38,28±0,17 *	38,52±0,13 *

- $P < 0.001$, Carmustine uygulamasından 15 dakika öncesi ile kıyaslandığında.



Şekil 21. Melatonin'in, maternal Carmustine etkisine maruz kalan yeni doğan sıçanlarda vücut ağırlıklarının gruplara göre karşılaştırılması. K, kontrol; SF, serum fizyolojik; N: 28- 41; * $P < 0.001$ SF veya K grubuyla kıyaslandığında; # $P < 0.001$, Carmustine grubuyla kıyaslandığında.

4.1.1.2.Mikroskopik Bulgular

4.1.1.2.1 Işık Mikroskopi Bulguları

4.1.1.2.1.1 Histokimyasal Bulgular

H&E Boyama

Kontrol grubu: EGL, MZ ve İGL belirgindir. Her üç zonda da yer yer interselüler aralıklar görülmesine rağmen, MZ'deki hücreler arasında interselüler aralık belirgin değildir. İnterselüler aralıkların varlığı, maturasyonun devamını göstermektedir. Purkinje hücre perikaryonu tabakasından oluşacak stratum gangliosum tam olarak oluşmamış durumdadır. EGL'nin azalması ve hücrelerin radyal şekilde dizilmiş olması radyal göçün devamını göstermektedir. Yetişkinde tek sıralı uniform yapıdaki bu tabaka yeni doğanda 3- 4 sıralı bir imaj vermektedir. Cerebellar nukleuslar, kesit düzleminde multipolar nöronların varlığı ile saptanmıştır. SVZ'deki hücrelerde yer yer yoğunluk fazladır. Ventriküllerdeki koroid pleksusta hücre dizilimleri yetişkindekine benzer şekildedir. Ependimal

hücrelerde mikrovillus yapıları belirgin değildir. Kapiler damarlar substantia alba'da belirgin olup yetişkindeki stratum moleculare imajı henüz oluşmamıştır. Piamater ve zar yapıları belirginleşmiştir (**Şekil 22**).

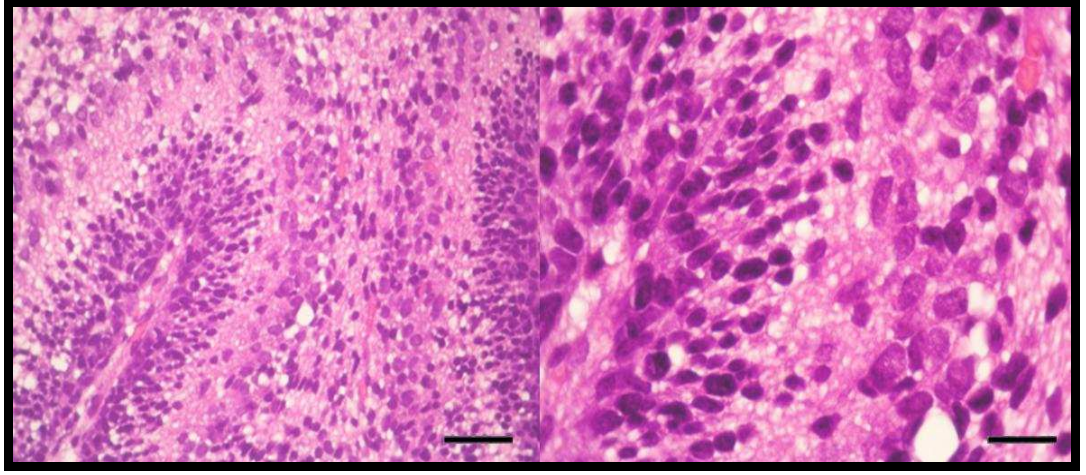
SF grubu; Kontrol grubuna benzer bulgular mevcut olup MZ keskin olmasa da belirgin bir hal almıştır. Migrasyon gözlemlenmekte olup EGL azalmıştır. İnterselüler aralıklar azalmış görülmektedir. Cerebellar nukleuslar gelişmiştir. MZ'deki hücreler 3- 4 sıralı dağılmış olarak saptanmış ve İGL iyi gelişmiştir (**Şekil 23**).

Melatonin- Kontrol Grubu; EGL, MZ ve İGL oldukça belirgindir. İGL iyi gelişmiştir. EGL'deki hücre yoğunluğu devam etmesine rağmen inceltme görülmektedir. EGL'deki hücrelerin nukleusları heterokromatik özellik göstermektedir. SVZ'de yer yer kalın görünmesine rağmen ventriküllere bakan kısım normal histolojik yapıdadır. İnterselüler aralıklar az miktarda görülmüştür. 3- 4 sıralı Purkinje hücre perikaryonları MZ'de saptanmıştır. Gelişimin devamıyla uyumlu olarak İGL yetişkin formasyonu almamıştır. Koroid pleksus yetişkindekine benzer histolojik yapı göstermektedir. Kapiler damarlar substantia alba'da daha belirgin durumdadır. Substantia alba içinde yer yer nöron perikaryonlarının varlığı saptanmıştır. Hücrelerin maturasyonu devam etmektedir (**Şekil 24**).

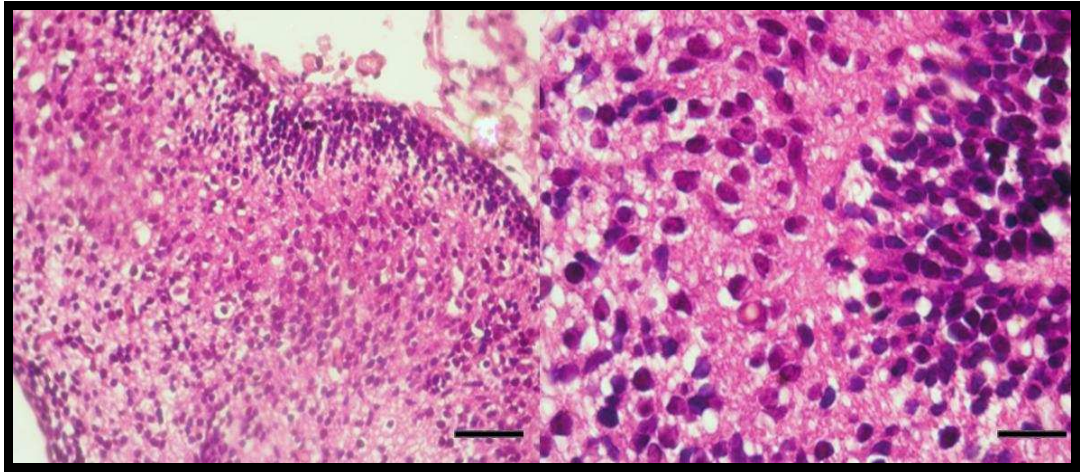
Carmustine Grubu; EGL hücre tabakası kontrol gruplarına oranla daha kalındır (**Şekil 28**). MZ geniş, SVZ kontrollere kıyasla daha kalın olarak gözlemlenmiştir. EGL ve MZ arasında diğer gruplara oranlara daha fazla, geniş ve belirgin interselüler aralıklar mevcuttur. 7- 8 sıralı Purkinje hücre tabakası saptanmıştır. EGL'deki hücreler yoğun olarak bir alanda toplanmaktadır. Özellikle diğer gruplar kadar belirgin olmayan sulkusların etraflarında göçün devamını gösteren

radial dizilim saptanmıştır. Halen göçün ileri dönemde devam edebileceğini gösteren hücre popülasyonu mevcuttur. MZ'deki Purkinje hücre morfolojisi oldukça yaygın gözlemlenmiştir. İGL'nin substantia alba'ya bakan kısmında da benzer perikaryonlar saptanıp bu da Purkinje hücre göçünde geri kalan hücreler olarak tanımlanmıştır. Cerebellar nukleuslar kesitlerde belirgin olmasına rağmen sulkuslar belirgin değildir ve folia görünümü kontrollerden daha geridir. Sulkus derinliği az bulunup gelişimin geri kaldığı saptanmıştır. MZ ve İGL tabakalarında damarlarda dilatasyon mevcuttur. Koroid pleksus diğer gruplara oranla hücre yoğunluğu ve damar dilatasyonu yönünden oldukça farklıdır (**Şekil 25**).

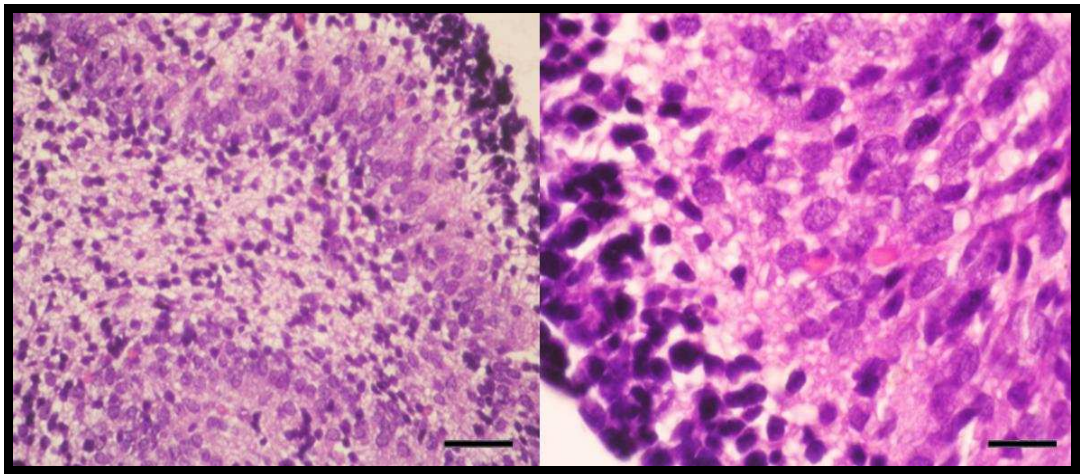
Carmustine+ Melatonin Grubu; EGL'de yer yer incelleme saptanmış ve kalınlığı deney grubuna oranla daha azalmıştır. Folia oluşumunda sulkusların derinliği SF grubuna yakın durumdadır. MZ hücreleri dağınıktır ancak, kontrol grubuna göre geniş bir alanı kapsamaktadır. EGL'de göç eden hücrelerin radial dizilimleri mevcuttur. İGL'de tam bir hücre popülasyonu oluşturulmamıştır. EGL ve İGL'nin griftliği mevcuttur. İnterselüler aralıklar Carmustine grubuna göre azalmış olarak saptanmıştır. EGL'deki hücrelerin heterojenitesi mevcut olup Purkinje hücre perikaryonları normale yakın yapıda görülmüştür (**Şekil 26**).



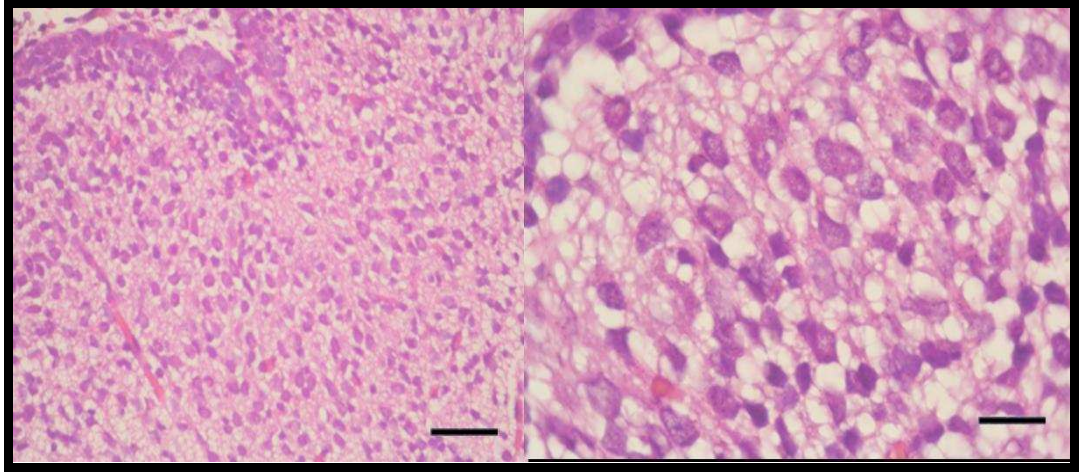
Şekil 22. Kontrol grubu H&E Boyama X40 **Bar:** 125 µm
X100 **Bar:** 50 µm



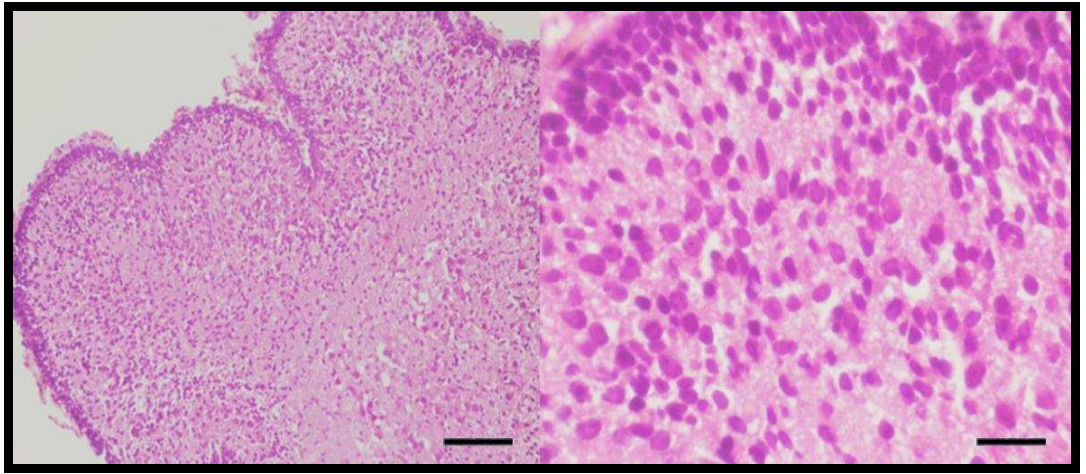
Şekil 23. SF grubu H&E Boyama X20 **Bar:** 250 µm
X100 **Bar:** 50 µm



Şekil 24. Melatonin- Kontrol grubu H&E Boyama X40 **Bar:** 125µm
X100 **Bar:** 50 µm



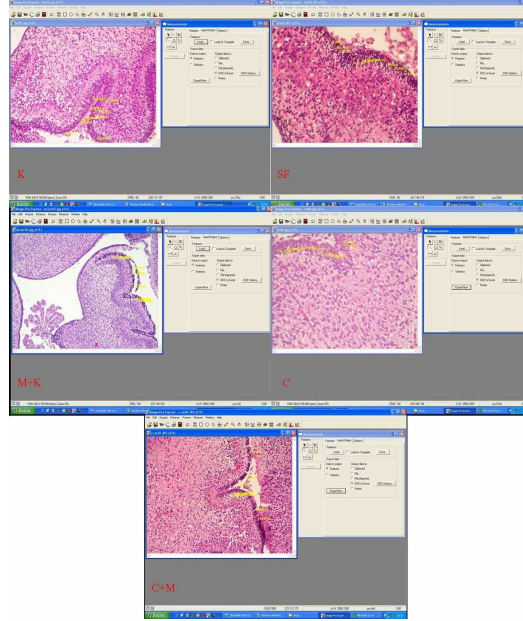
Şekil 25. Carmustine grubu H&E X40 **Bar:** 125 μm
X100 **Bar:** 50 μm



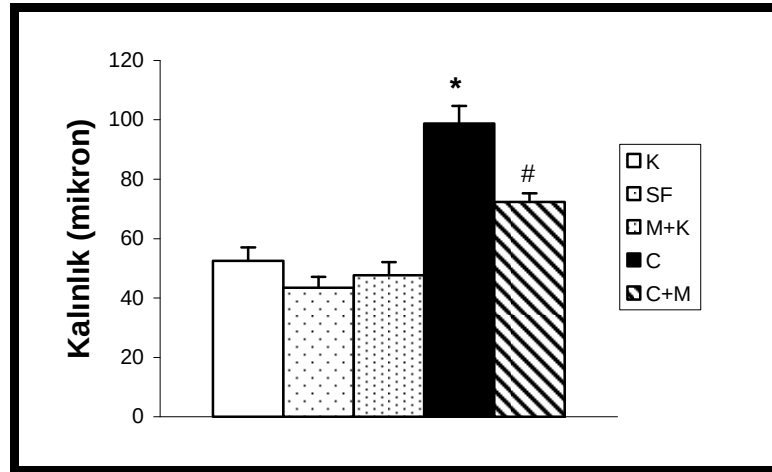
Şekil 26. Carmustine+ Melatonin grubu H&E Boyama X20 **Bar:** 250 μm
X100 **Bar:** 50 μm

EGL kalınlığı ölçümü

EGL hücre tabakasının Image-Pro Express 4.5 (Media Cybernetics, inc. USA) programı kullanılarak mikron cinsinden kalınlığı ölçülüp elde edilen datalar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 27. Image-Pro Express 4.5 kullanılarak her grup için N:10 örnekten ölçümler alınmıştır.



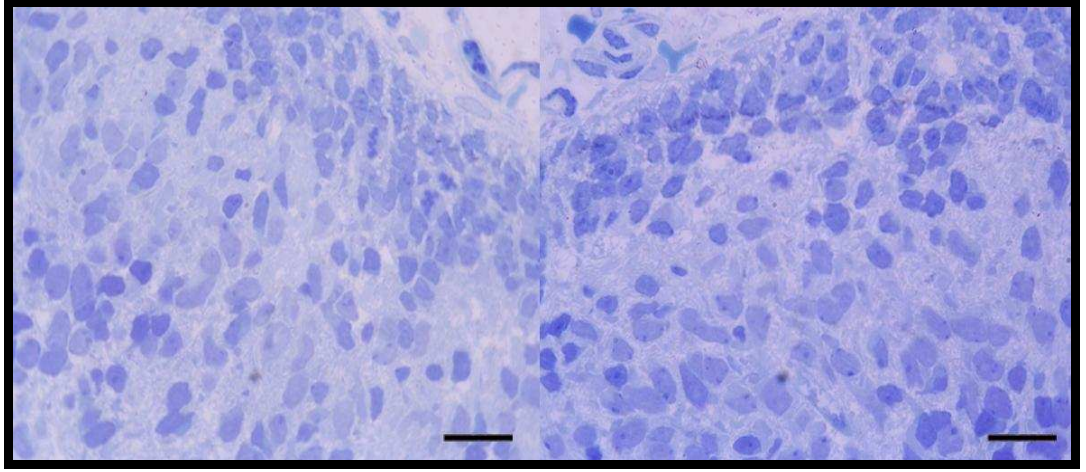
Şekil 28. Melatonin'in maternal Carmustine etkisine maruz kalan yeni doğan sıçan cerebellumlarında EGL kalınlığına etkisi (mikron). K, kontrol; SF, serum fizyolojik; N: 10; * $P < 0.001$ SF veya K grubuyla kıyaslandığında; # $P < 0.001$, Carmustine grubuyla kıyaslandığında.

Toluidin Blue Bulguları

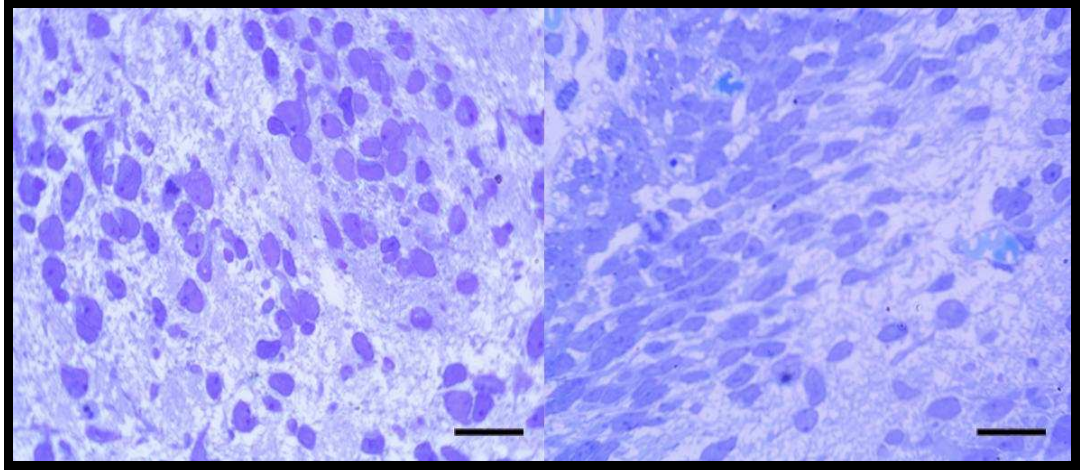
Kontrol, SF, Melatonin- Kontrol grubu H&E boyamadaki bulgulara eş bulgular saptanmıştır. EGL azalmış, MZ de 3- 4 sıralı Purkinje hücre formasyonuna ulaşmıştır. İnterselüler aralıklar az olarak görülmüştür. Sulkuslarda yer yer göçün devamını gösteren radyal dizilim izlenimi alınmıştır (**Şekil 29-30-31**).

Carmustine Grubu MZ'deki bazı hücrelerde multipolar nöron maturasyonu yerine atipik perikaryonlara sahip hücreler şeklinde görülmüştür. EGL'de mitotik figürlerin yoğunluğu saptanmıştır. Bu mitotik figürlü görünüm MZ'deki Purkinje hücre imajlarının yan komşuluğunda da mevcuttur. Mitotik figürler EGL'den muhtemel göç eden hücrelerde de belirlenmiştir. MZ'deki hücrelerin nükleus ve nükleolusları perikaryonlarda periferik ve geniş yerleşim göstermektedir. Hücrelerin nükleuslarının nükleoplazmaya oranı yüksek olarak saptanmıştır. Apikal dendritler düzensiz, geniş gözlenmiştir. Cerebellar nükleuslarda multipolar nöron yerine MZ'deki hücrelere benzer konumdaki dev bir balona benzeyen "Balon hücreler" saptanmıştır. Tüm gruplarda küçük çaplı aksonlarda miyelinizasyonun başlangıç dönemini işaret eden yapılar gözlemlenmesine rağmen, deney grubunda bu aksonlar az yoğunlukta saptanmıştır (**Şekil 32**).

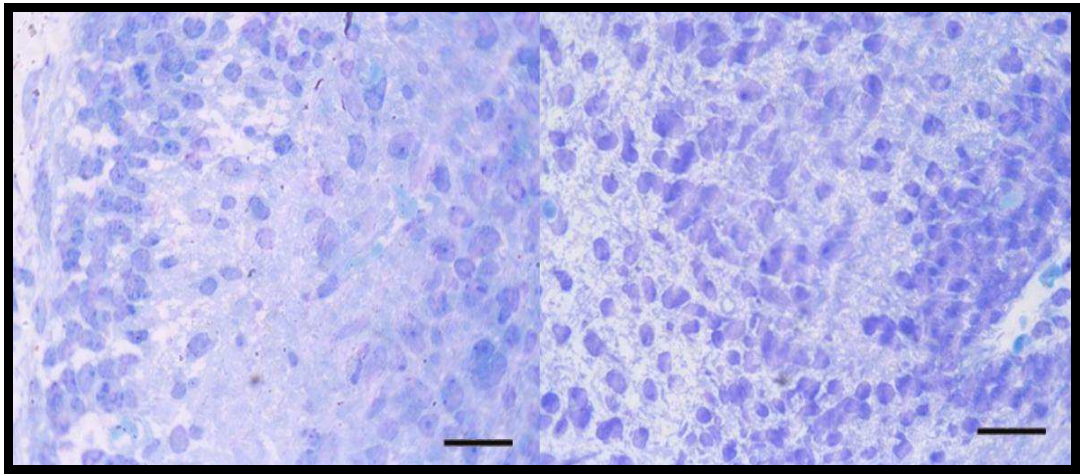
Carmustine+ Melatonin Grubu MZ'deki hücreler heterojenik olarak dağılmıştır. Nadiren periferik yerleşimli nükleuslara sahip hücrelere de rastlanmıştır. İnterselüler aralıklar kontrollere yakın şekilde gözlemlenmiştir. EGL ise kontrol gruplarına göre daha geniş saptanırken Carmustine grubuna göre daha incelmış olarak görülmüştür, bu da göçün devam ettiğinin belirtisi olarak kabul edilmiştir. EGL'de mitotik figürlü hücreler Carmustine grubuna göre daha az saptanmıştır (**Şekil 33**).



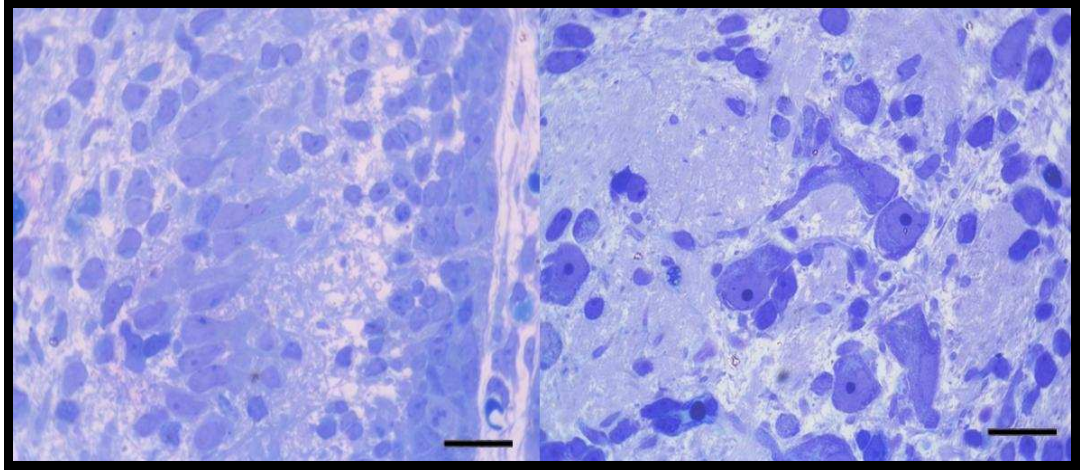
Şekil 29. Kontrol grubu Toluidin Boyama. X40 **Bar:** 125 μm



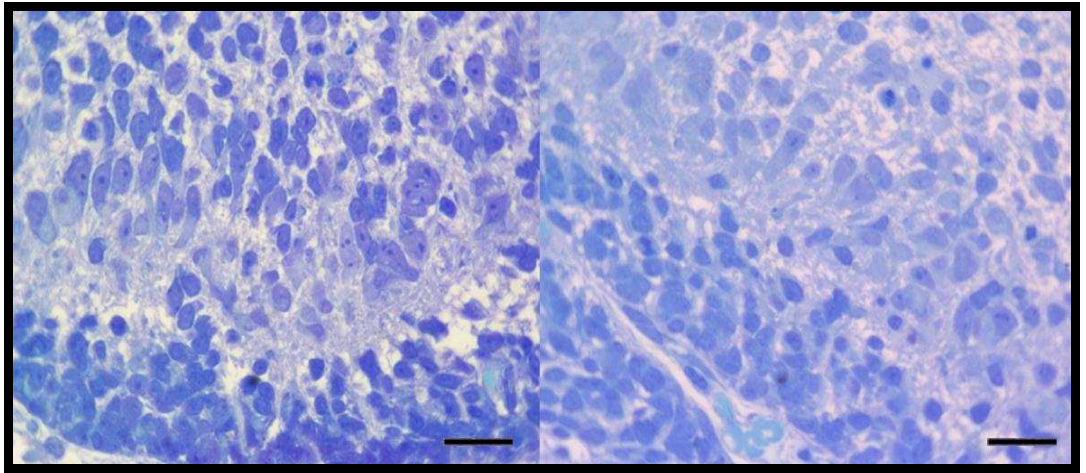
Şekil 30. SF grubu Toluidin Boyama. X40 **Bar:** 125 μm



Şekil 31. Melatonin- Kontrol grubu Toluidin Boyama. X40 **Bar:** 125 μm



Şekil 32. Carmustine grubu Toluidin Boyama X40 **Bar:** 125 μ m
X100 **Bar:** 50 μ m



Şekil 33. Carmustine+ Melatonin grubu Toluidin Boyama X40 **Bar:** 125 μ m

4.1.1.2.1.2 İmmunohistokimyasal bulgular

GFAP Boyama

Kontrol grubu; EGL’de GFAP(+) ve (-) hücre popülasyonu belirgin görülmüştür. MZ’de Purkinje hücrelerinin komşuluğundaki küçük nükleuslu hücrelerin genelde GFAP (+) oldukları saptanmıştır. İGL’de diğer tabakalara göre daha az immünreaktivite görülmüştür. Radyal uzantılara sahip hücrelerin EGL’den İGL’ye doğru uzantıları gözlemlenmiştir. İmmünreaktivitenin (+) olduğu hücreler korteksdeki diğer hücrelere benzemeyen histolojik görüntülere sahiptir ve az sayıda saptanmıştır. EGL ile İGL arasında longitudinal olarak paralel seyreden GFAP (+) uzantıların RGH ile morfolojik olarak uygun olduğu saptanmıştır. GFAP (+) hücre ve uzantılarının EGL’yi dışarıdan sınırladığı gözlemlenmiştir. (Şekil 34).

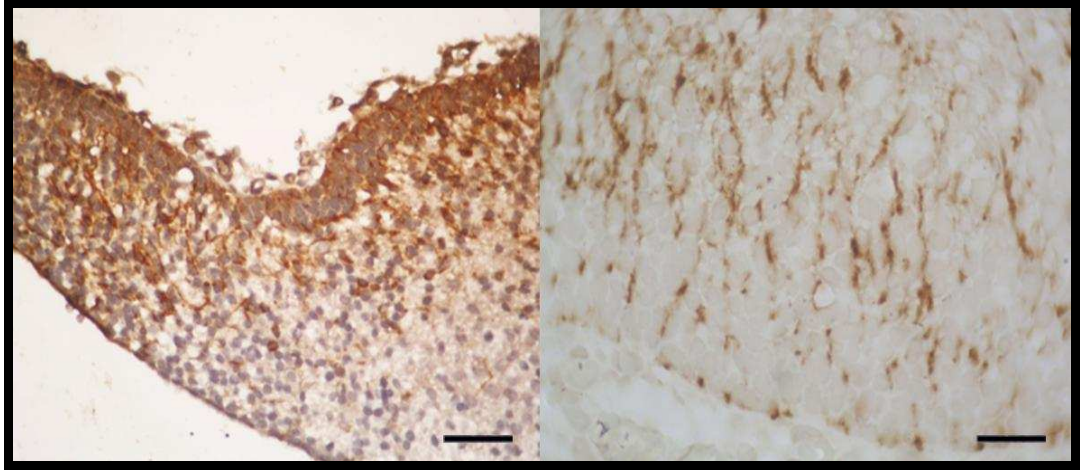
SF grubu; Tüm tabakalarda GFAP (+) immünreaktivitesi veren hücre ve uzantıları saptanmıştır. Dıştan içe longitudinal seyirli uzantılar GFAP (+) reaksiyon vermektedir. EGL’nin piamater komşuluğundaki GFAP (+) tek sıra hücrelerinde dıştan sınırlayıcı bir katman olan membrana glia limitans eksterna’nın belirginleşmeye başladığı saptanmıştır. Tabakalar içerisinde ve medullada periarteriyal yapıların etrafında da bir sınır oluşturduğu ve bunun da membrana glia limitans perivascularis yapısının olduğu saptanmıştır. Korteks sınırında GFAP (+) immunreaksiyonu veren hücreler tek sıra halinde görülür. EGL’den İGL’ye doğru radyal izlenen uzantıların GFAP (+) reaksiyon verdikleri izlenmektedir. Kesit düzleminde RGH uzantılarının transvers kesitleri ise kesitten geçiş düzlemiyle orantılı olarak değişmektedir (Şekil 35).

Melatonin- Kontrol Grubu; EGL ve MZ’deki Purkinje hücre perikaryonlarının yanında küçük nükleuslu hücrelerin ve uzantılarının GFAP (+) immunreaksiyonu

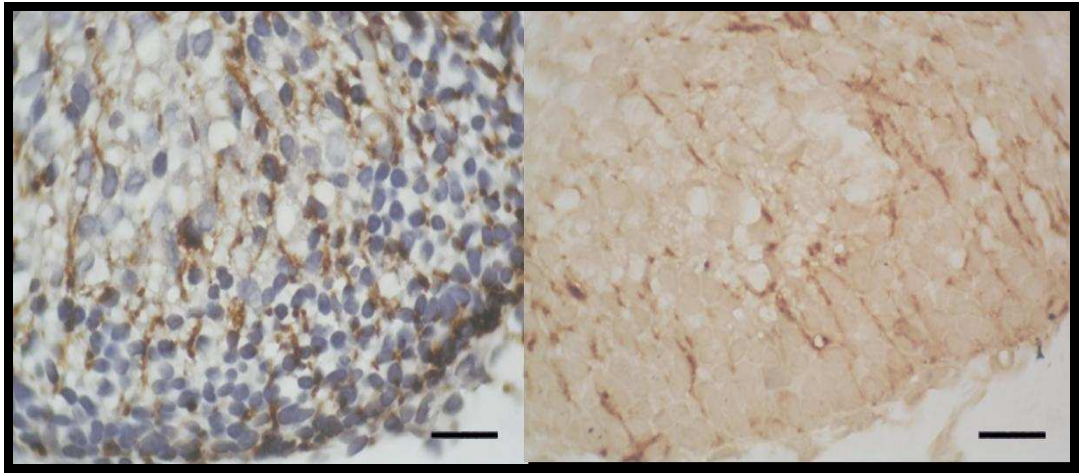
verdikleri saptanmıştır. Uzantıların yer yer radyal oldukları görülmüş, ayrıca kesit düzleminde bu uzantıların transvers kesitlerine rastlanmıştır. Tüm bulgular SF ve kontrol grupları ile uyumludur. Membrana glia limitans belirginliği daha azdır (**Şekil 36**).

Carmustine Grubu; RGH'ler az miktarda saptanmıştır. EGL'de GFAP (+) reaksiyon veren yapılar yok denecek kadar azdır ve daha geniş yer tutan MZ'de saptanmaktadır. Uzantıların transvers kesitleri görülebilmektedir. Kesitlerdeki gliaların GFAP (+) durumlarına göre tanımlanması protoplazmik astrositlere benzerlik göstermektedir. Membrana glia limitans perivascularis'in oluşumunun tamamlanmadığı ve belirgin olmadığı görülürken, membrana glia limitans eksterna yapısının oluşmadığı belirlenmiştir (**Şekil 37**).

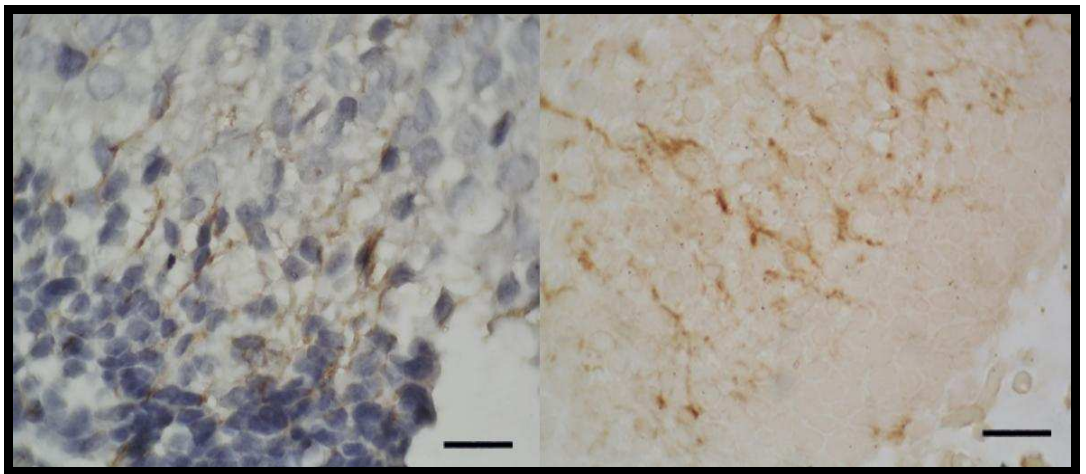
Carmustine+ Melatonin Grubu; EGL daralmış olarak görülmüştür, ancak GFAP (+) hücrelerin uzantıları izlendiğinde reaksiyonun az olduğu, çoğunlukla kesit düzleminden transvers geçtiği görülmüştür. Membrana glia limitans eksterna'nın oluşum aşamasında olduğu saptanmıştır. Buna karşın membrana glia limitans perivascularis'in belirgin biçimde oluştuğu gözlemlenmiştir. EGL'de GFAP (+) reaksiyon olduğu görülmüş olup göçün devam ettiği saptanmıştır. Bu grupta Carmustine grubuna göre daha fazla immunreaktivite gözlemlenmiştir. Carmustine hariç diğer gruplardan belirgin fark saptanmamıştır (**Şekil 38**).



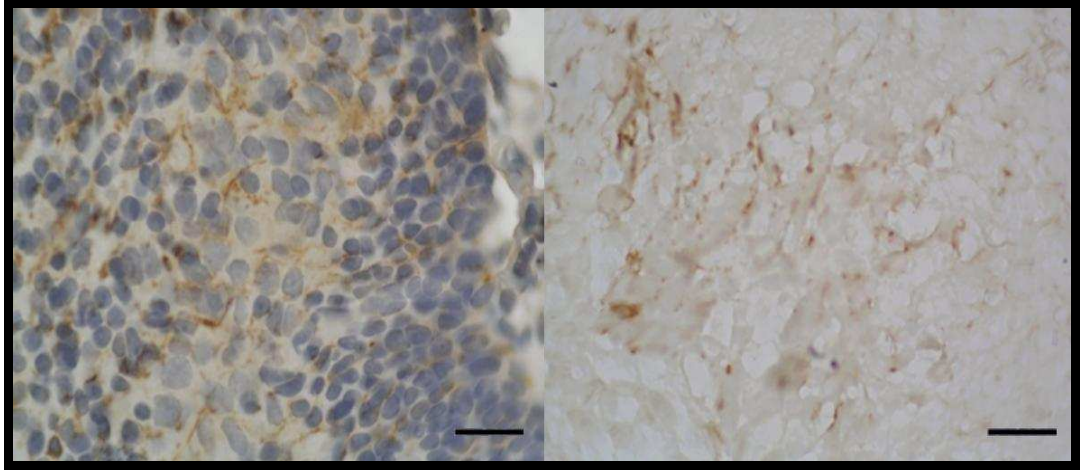
Şekil 34. Kontrol grubu GFAP Boyama. X20 **Bar:** 250 μm
X100 **Bar:** 50 μm



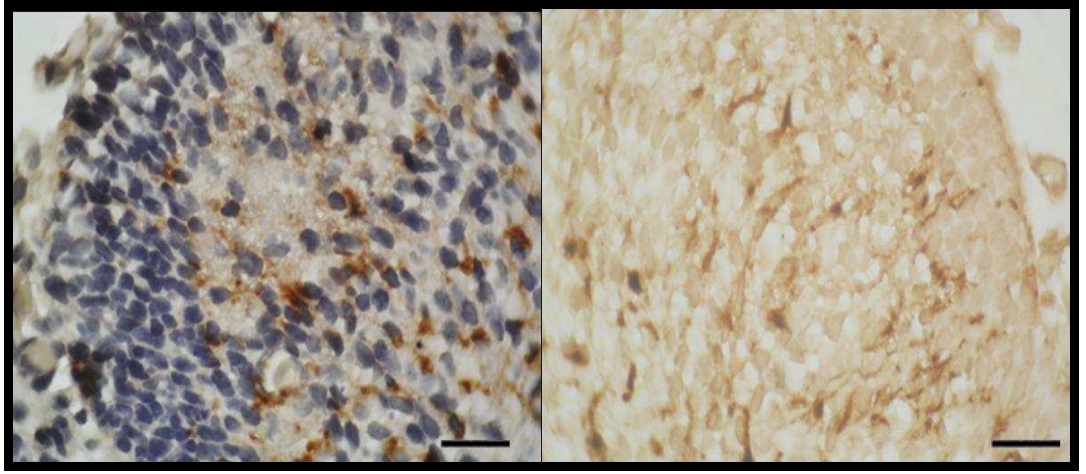
Şekil 35. SF grubu GFAP Boyama. X100 **Bar:** 50 μm



Şekil 36. Melatonin- Kontrol grubu GFAP Boyama. X100 **Bar:** 50 μm



Şekil 37. Carmustine grubu GFAP Boyama. X100 **Bar:** 50 μm



Şekil 38. Carmustine+ Melatonin grubu GFAP Boyama. X100 **Bar:** 50 μm

4.1.1.4.2 Synaptophysin Boyama

Kontrol grubu; Synaptophysin immünreaktivitesi EGL’de saptanmamıştır. MZ ve İGL’de yoğun ve belirgin olarak reaksiyon gözlemlenmektedir. Ayrıca, EGL’nin MZ’ye bakan yüzeyinde oldukça yüksek immünreaksiyon mevcuttur.

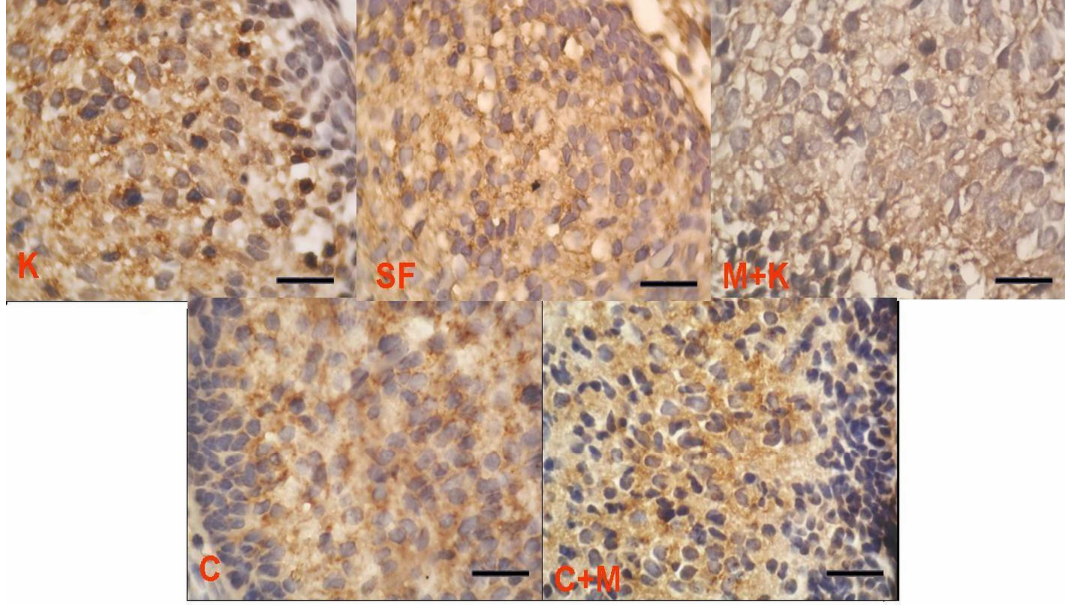
SF grubu; Kontrol grubuna benzer şekilde EGL’de reaksiyon yoktur. İGL ve MZ de oldukça yoğun reaksiyon mevcuttur.

Melatonin- Kontrol Grubu; İGL ve MZ’de reaksiyon saptanmıştır. Purkinje hücre perikaryonları etrafında daha yoğun immünreaksiyon hakim olarak gözlemlenmiştir.

Carmustine Grubu; İmmünreaktivite kontrol gruplarına oranla daha az gözlemlenmiştir.

Carmustine+ Melatonin Grubu; Deney grubuna göre daha yüksek immunoreaksiyon görülürken bunun kontrol gruplarına oranla daha az olduğu tespit edilmiştir. EGL’nin MZ’ye komşuluğunda kontrol gruplarındaki gibi immünreaksiyon yoğun görülmüştür.

Tüm bu bulgular sinaptogenesizin başladığının belitecidir. Ancak, Carmustine grubunda Synaptophysin immünreaksiyonun az gözlemlenmesi; maturasyonun geciktiği ve malformasyon bulgularına eşlik edeceği öngörüsünü desteklemektedir (**Şekil 39**).



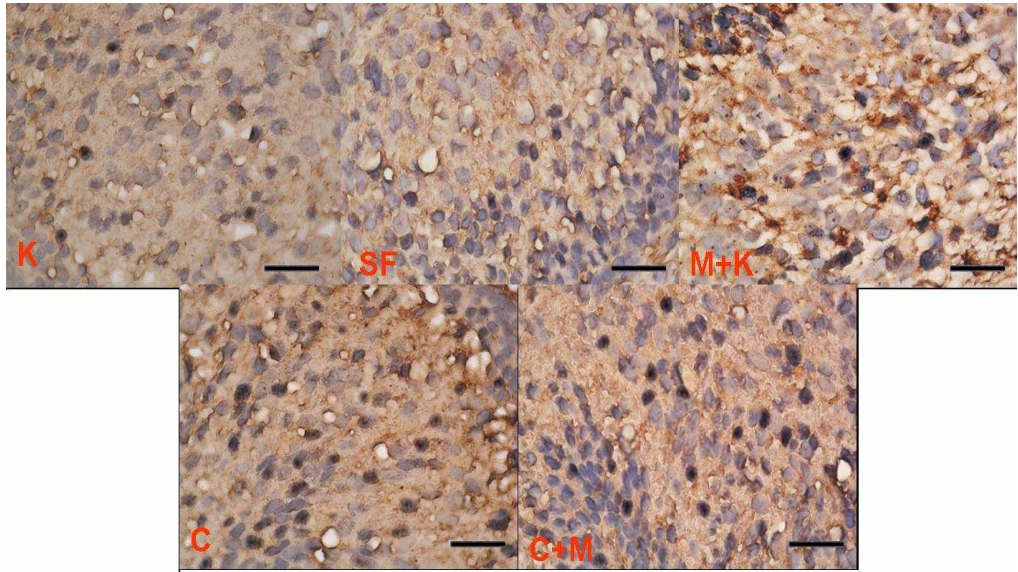
Şekil 39. Synaptophysin Boyama. X100 Bar: 50 µm

4.1.1.4.3 Nestin Boyama

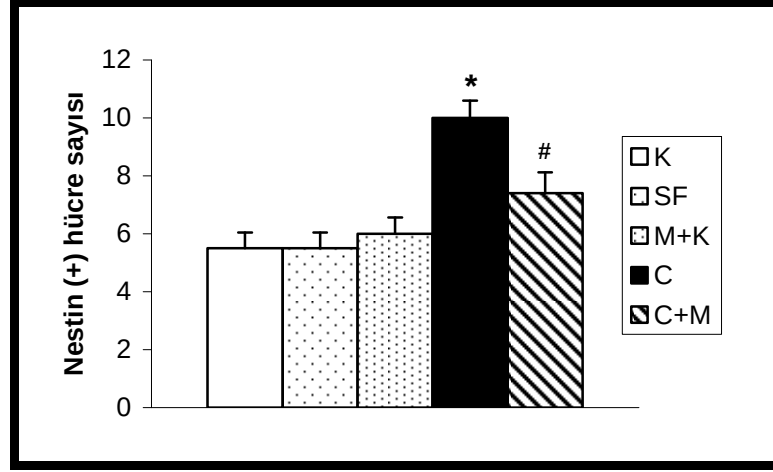
Kontrol, SF, Melatonin- Kontrol grubu; Nestin (+) immünreaksiyon veren hücreler MZ’de az sayıda ve EGL’nin MZ’ye bakan yüzünde saptanmıştır.

Carmustine Grubu; Bu grupta MZ’de ve EG’nin MZ’ye bakan kısmında yüksek Nestin (+) immünreaksiyonuna rastlanmıştır.

Carmustine+ Melatonin Grubu; Bu grupta kontrol gruplarından yüksek fakat Carmustine grubundan az immünreaksiyon veren hücrelere rastlanmıştır.



Şekil 40. Nestin Boyama. X100 Bar: 50 µm



Şekil 41. Melatonin'in, maternal Carmustine etkisine maruz kalan yeni doğan sıçan cerebellumlarında Nestin (+) boyanan hücre sayısının değerlendirilmesi. K, kontrol; SF, serum fizyolojik; N: 10; * $P < 0.001$ SF veya K grubuyla kıyaslandığında; # $P < 0.05$, Carmustine grubuyla kıyaslandığında

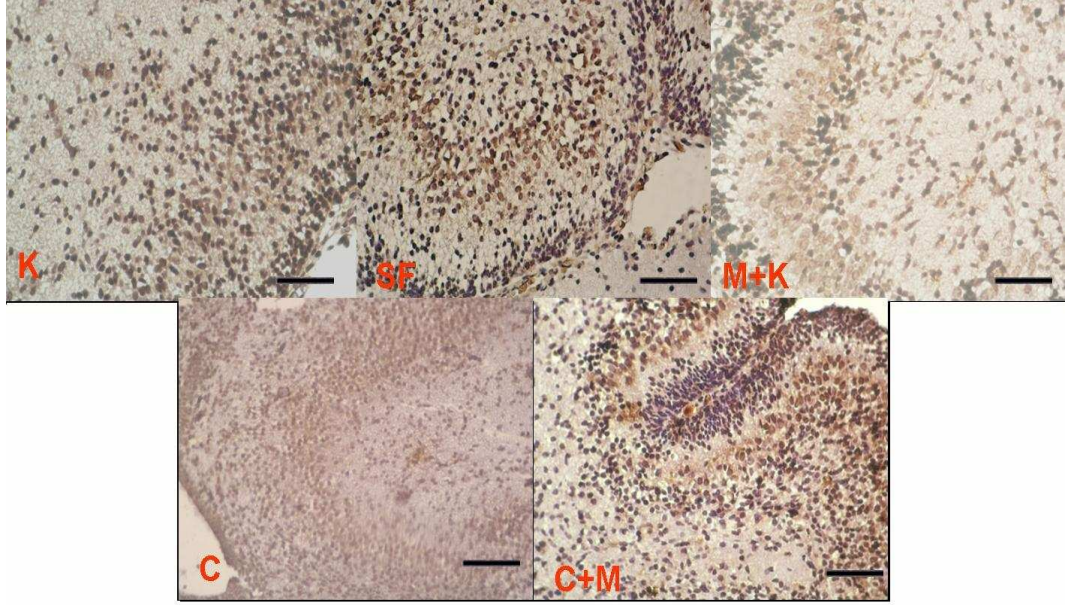
Gerek görüntüler gerekse **Şekil 41**'den anlaşılacağı üzere Carmustine grubunda hücre diferansiyasyon ve maturasyonunda gecikme belirgindir.

4.1.1.4.4 TGF- β 1 Boyama

Kontrol, SF, Melatonin- Kontrol Grupları; MZ'deki Purkinje hücre perikaryonlarının TGF β 1 (+) reaksiyon verdiği görülmüştür. Ayrıca, çok az sayıda TGF β 1 (+) hücrenin İGL içerisinde olduğu saptanmıştır.

Carmustine Grubu; Oldukça geniş bir MZ'ye yayılan TGF β 1 (+) hücreler kontrole oranla daha az immunreaksiyon vermektedir. İGL içerisinde bazı hücrelerde yine TGF β 1 (+) reaksiyon saptanmıştır.

Carmustine+ Melatonin Grubu; TGF β 1 (+) reaksiyonun genelde MZ'deki hücrelerde yoğunlaşmış olduğu görülmesine rağmen İGL'de Carmustine grubundakine oranla daha az sayıda TGF β 1 (+) hücrenin varlığı saptanmıştır (**Şekil 42**).



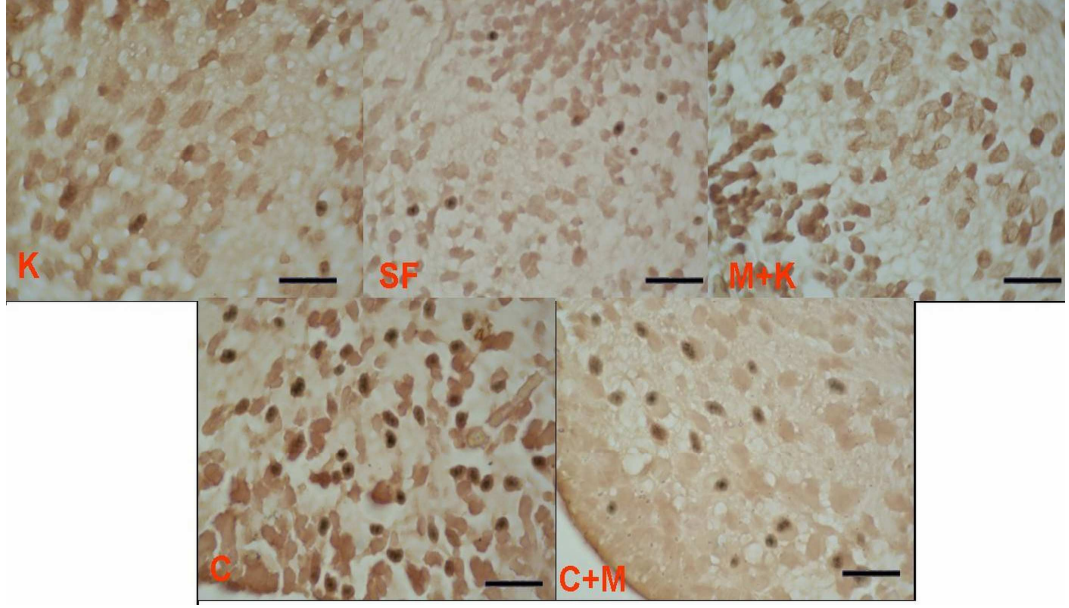
Şekil 42. TGF- β 1 Boyama X40 Bar: 125 μ m

4.1.1.4.5 TUNEL Boyama

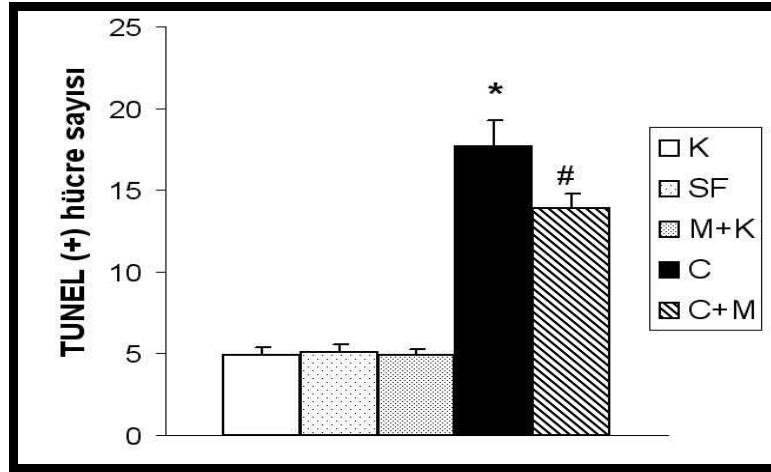
Kontrol, SF, Melatonin- Kontrol grupları; TUNEL (+) hücreler EGL'de özellikle EGL'nin MZ'ye bakan yüzünde saptanmıştır.

Carmustine Grubu; Bu grupta MZ'de ve EGL'nin MZ'ye bakan kısmında yüksek TUNEL (+) immunreaktivitesine rastlanmıştır.

Carmustine+ Melatonin Grubu; Bu grupta kontrol gruplarından yüksek fakat Carmustine grubundan az immunreaksiyona rastlanmıştır (Şekil 43).



Şekil 43. TUNEL Boyama. X100 Bar: 50 µm



Şekil.44. Melatonin'in, maternal Carmustine etkisine maruz kalan yeni doğan sıçan cerebellumlarında TUNEL (+) hücre sayısı üzerine etkisi. K, kontrol; SF, Serum fizyolojik; N: 10; * $P < 0.001$, SF veya K grubuyla kıyaslandığında; # $P < 0.05$, Carmustine grubuyla kıyaslandığında.

Tablo 3. Histopatolojik ve Embriyolojik değişiklikler

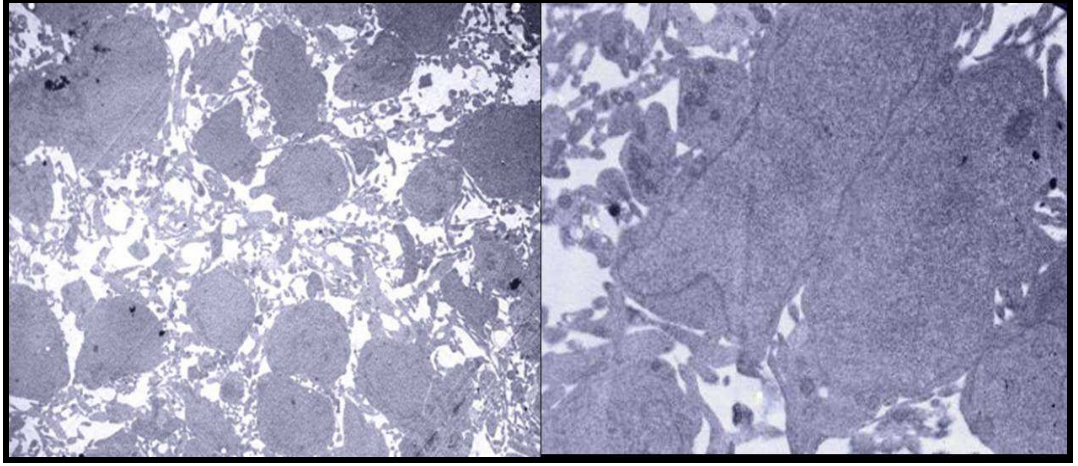
	Kontrol Grubu	Sf Grubu	Melanonin kontrol grubu	Carmustine grubu	Carmustine + Melatonin grubu
EGL tabaka kalınlığı	+	+	+	+++	++
İnterselüler aralık	+	+	+	+++	+
İGL tabaka gelişimi	+++	+++	+++	+	++
Dev Balon hücre	-	-	-	+	-
GFAP immunreaktivitesi	+++	+++	+++	+	++
Radiyal Glial Hücre yoğunluğu	+++	+++	+++	+	++
Synaptophysin immunreaktivitesi	+++	+++	+++	+	++
Nestin (+) hücre sayısı	+	+	+	+++	++
TUNEL (+) hücre sayısı	+	+	+	+++	++
TGF β 1 immunreaktivitesi	+++	+++	+++	+	++

4.1.1.2.2. Elektron mikroskopik bulgular

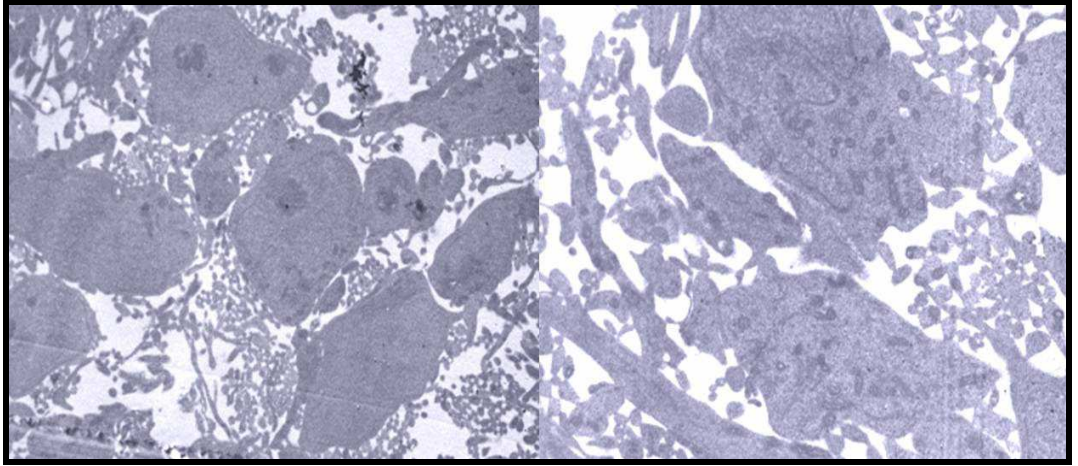
Kontrol, SF, Melatonin- Kontrol grubu; Purkinje hüccresine özel nöron perikaryonu ile birlikte büyük ve küçük nöron perikaryonları da saptanmıştır. Bu nöronlarda ökcromatik nükleuslar belirgindir ve gruplar oluşturmuştur. İnterselüler aralıklar gözlemlenmiştir. Aksonal filopodia, dendritik uzantılar ve bunların yanısıra glial uzantı kesitleri de hücrelerle birlikte görülebilmektedir. Koyu gözlemlenen kesit alanlarında aktin filamenti ve bağımlı olarak gliaların, aksonal filopodiaların yer yer bağlantıda olduğu görülmüştür. Bu da gruplara ait örneklerin sinaptogenezisin maturasyon döneminde olduğu sonucuna varılmıştır. Hücre perikaryonları komşuluğunda bulunan aksosomatik sinapsların yanısıra uzun, geniş sitoplazmik kesitlerde muhtemel RGH'lerin migrasyona yardım ettikleri görülmektedir. Kan- beyin bariyeri için oluşumun tamamlanmaya yakın olduğu saptanmıştır (Şekil 45-46-47) .

Carmustine grubu; İnterselüler aralıklar kontrol gruplarına göre geniş saptanmıştır. Purkinje, büyük ve küçük nöronların yanısıra balonlaşmış hücreler de saptanmıştır. Geniş interselüler aralıklar sebebiyle kan- beyin bariyeri için imaj tamamlanmamıştır. Yer yer RGH'lerin sitoplazmik kesitleri saptanmıştır. Bu hücreler ve nöron arasında gap- junctionlar görülmektedir. Buradaki nöron nükleuslarının büyük çoğunluğu heterokromatik olup kontrol gruplarına kıyasla ökromatik nükleuslu hücreye ender rastlanmıştır. Aksonal filopodiyalar ve glial uzantılar diğer gruplara göre daha az sayıda genellikle ayrık oluşuyla sinaptogenezisin başlangıç aşamasında olduğu görülmüştür. Özellikle aksosomatik sinaps görüntüsü belirgin değildir (**Şekil 48**).

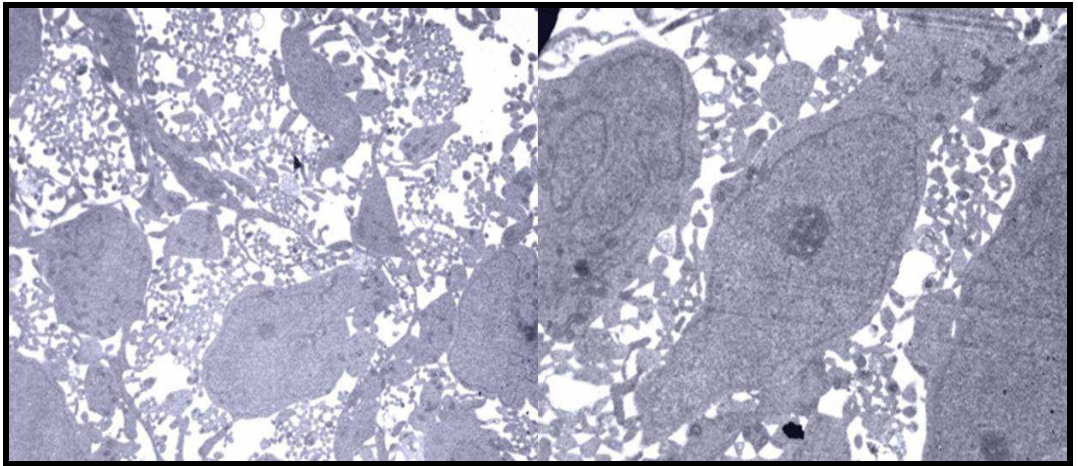
Carmustine+ Melatonin grubu; Kontrol gruplarına göre aralıklar daha geniş ancak aksonal filopodia, aksosomatik sinapslar deney gruplarına göre daha belirgindir. Glial hücre uzantıları aktin içeriklerinin fazla olması nedeniyle aksonal dendritik uzantıların arasında koyu renkli olarak yer almaktadır. Ancak Purkinje hücrelerine ait nükleuslar, ökromatiktir. Nükleusları belirgin olmasına rağmen nükleolemmal invaginasyon, perinüklear bölgede yoğunluğun az olmasıyla melatonin etkisinin deney grubundaki dramatik histogenezis ve retardasyonu engellediği ultrastrüktürel olarak görülmüştür (**Şekil 49**).



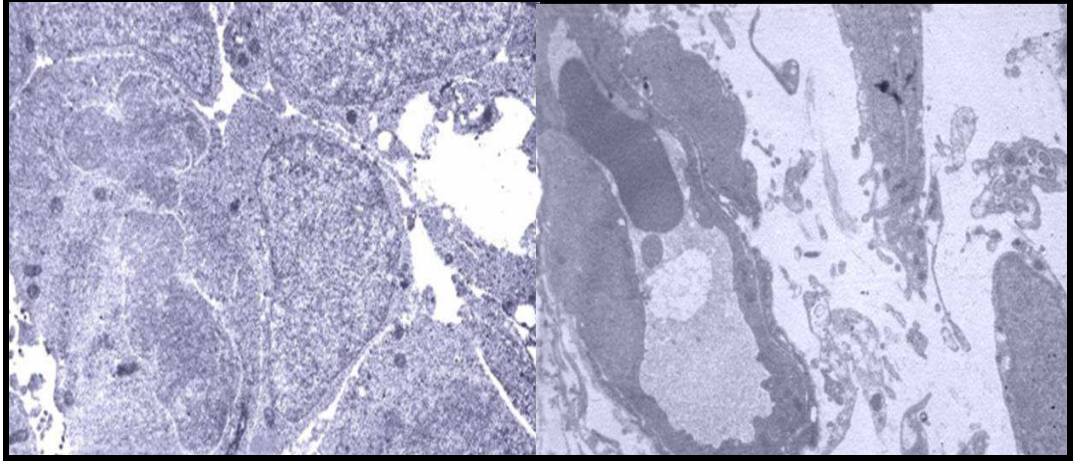
Şekil.45. Kontrol grubu elektron mikroskopik görüntü. Uranil asetat-Kurşun nitrat boyama (X 3000-X12.000 büyütme).



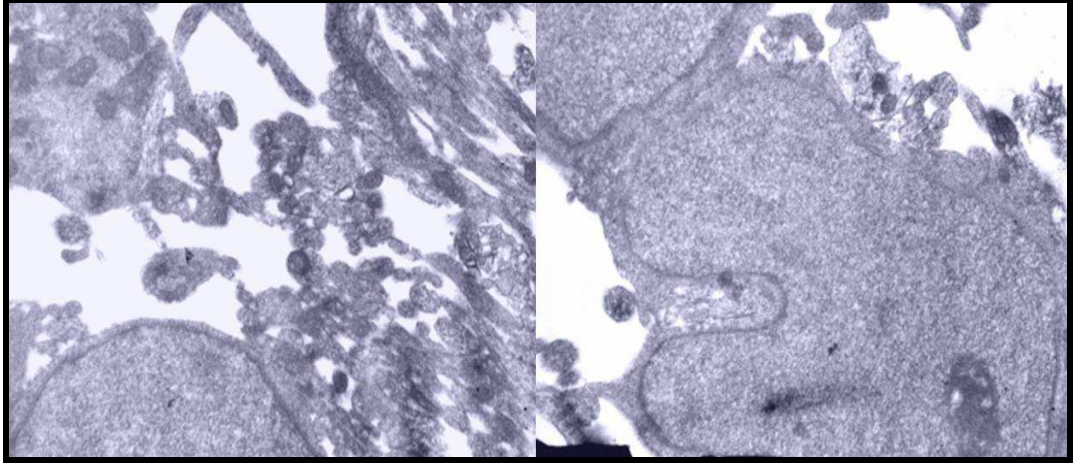
Şekil.46. SF grubu elektron mikroskopik görüntü. Uranil asetat-Kurşun nitrat boyama (X 6000-X12.000 büyütme).



Şekil.47. Melatonin+ Carmustine grubu elektron mikroskopik görüntü. Uranil asetat-Kurşun nitrat boyama (X 6000-X10.000 büyütme).



Şekil.48. Carmustine grubu elektron mikroskopik görüntü. Uranil asetat-Kurşun nitrat boyama (X 5000-X12.000 büyütme).



Şekil.49. Carmustine+ Melatonin grubu elektron mikroskopik görüntü. Uranil asetat-Kurşun nitrat boyama (X 20.000 büyütme).

4.1.2. BİYOKİMYASAL BULGULAR

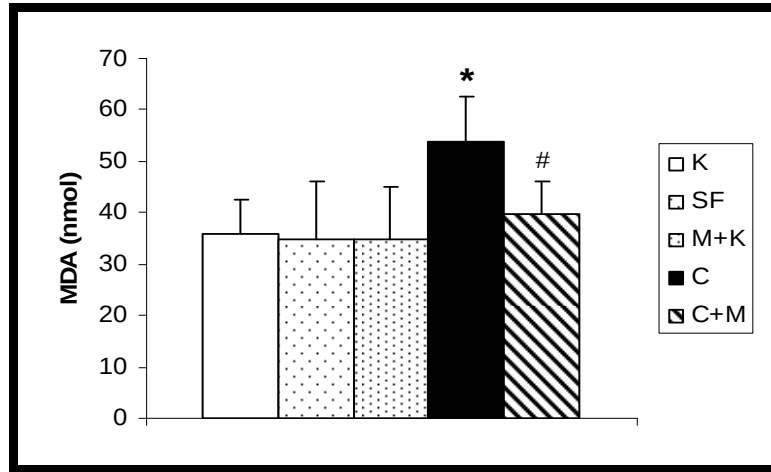
Tablo 4. Maternal Carmustine etkisine maruz kalan yeni doğan sıçanlarda cerebellum MDA ve SOD düzeylerine melatoninin etkisi. N = 6-9. SF, serum fizyolojik

	MDA (nmol)	SOD (U/mg protein)
Kontrol	36,02±6,65	0,41±0,55
SF	34,79±11,41	0,30±0,31
Melatonin-Kontrol	34,96±10,21	0,37±0,30
Carmustine	53,98±8,51 *	0,20±0,26
Carmustine+Melatonin	39,86±6,26 #	0,33±0,08

* P<0,01; kontrol ve SF grubuyla kıyaslandığında

P<0,01; Carmustine grubuyla kıyaslandığında

MDA ölçümlerinde istatistiksel olarak anlamlı bi sonuç elde edilirken, SOD ölçümlerinde anlamlı bir sonuç bulunamamıştır.



Şekil 50. Maternal Carmustine etkisine maruz kalan yeni doğan sıçanlarda cerebellum MDA düzeylerine melatoninin etkisi. Veriler ortalama ± standart deviasyon olarak verilmiştir. K, kontrol; SF, serum fizyolojik. N = 6-8. *

P<0,01; Kontrol ve SF grubuyla kıyaslandığında, [#]P<0,01; Carmustine grubuyla kıyaslandığında.

5. BÖLÜM IV

5.1. TARTIŞMA

Cerebrum ve cerebellum korteksinde fokal yada jeneralize malformasyonları açıklamak için kortikal displazi terimi kullanılır [14, 20]. Displaziler intrauterin evrelerde anormal kök hücre gelişimi, göç hataları ve proliferasyona bağlı sekonder malformasyonlardır [14, 20, 149]. Kortikal displazi ise intrauterin süreçte proliferasyon (nöronal diferansiyasyon, nöro- glial etkileşim), nöronal göç ve maturasyon dönemlerine bağlı olarak değişen gelişimsel hataların neden olduğu kortikal malformasyondur [14, 20, 149, 153, 218].

Cerebral malformasyonlar sınıflandırırken, otörler büyük oranda cerebellumu ihmal etmişlerdir [14, 15, 20, 153]. Bunun nedeni olasılıkla cerebellar anomalilerin kognitif ve nörolojik sonuçları belirlemede daha önemli olduğunun düşünülmesidir [14, 15, 20]. Cerebelluma olan bu ilgisizlik, cerebral anomalilere kıyasla cerebellar anomalileri daha az anlamamıza yol açmıştır. Bunun da ötesinde, cerebellumun kognitif ve motor fonksiyonların yanı sıra öğrenme için de önemli olduğu her geçen gün daha detaylı açıklanmaktadır [14, 15, 20, 22, 153]. Ayrıntılı incelemeler sonucunda, diffüz cerebellar displazilere aşırı derecede cerebral lezyonların eşlik ettiği, ancak kortikal displazi tanımlanmamış olgularda da rastlantısal olarak gözlenebileceği gösterilmiştir [14, 27, 153].

Cerebellum kortikal displazik sendromları; Dandy-Walker kompleksi, cerebellar kortikal disgenezis, cerebellar yapıların hipogenezisine eşlik eden

anomaliler, Joubert sendromu ve rombensefalosinapsis olarak tanımlanmıştır [14]. Bu displazik sendromlarda ortak olarak görülen bulgular vermis hipogenezisi ve agenezisi, hipoplazi, polimikrogyria, lizensefali şeklindedir [13, 14].

Dandy-Walker gibi bazı özel durumlara radyolojik yayınlarda sıklıkla rastlanmaktadır. Ancak, Dandy-Walker malformasyonları ile diğer posterior fossa kistik malformasyonları arasındaki ilişkiye ait zıt görüşler bulunmaktadır. Dandy-Walker [16, 35, 171, 217] malformasyonları diğer cerebellar malformasyonlarla [188] birlikte de oluşabilir. Orta ve arka beyin “molar diş” tipi malformasyonları olarak bilinen Joubert [27, 100], Arima [11] ve Senior-Loken [126, 188, 193] sendromları, rombensefalosinapsis gibi cerebellumun diğer malformasyonları fazlaca tanımlanmamıştır. Bunların diğer cerebellar malformasyonlarla ilişkisi de açık değildir. Cerebellar hemisferik ve vermian malformasyonlar tanımlanmasına rağmen yeterince anlaşılamamıştır ve literatürde nadir olgu sunumları dışında yayına rastlanamamaktadır [87, 210].

Cerebellar vermis ve diğer düşük dereceli beyin sapı malformasyonlarıyla belirti gösteren Joubert sendromu histopatolojik olarak solunum düzensizliği, normal dışı göz hareketleri, ataksi ve mental retardasyon semptomlarını verir [239]. Joubert sendromunun nöropatolojik spektrumu bilinmez iken sadece Yachis ve Rorke’nin 2 tane otopsi olgusu mevcuttur [239]. Burada arka, orta beyin, pons ve medulla spinalis malformasyonu gösterilmiştir. Buna ek olarak cerebellar vermiste hiperplazi ve agenezis gözlenmiştir [239]. Makroskopik bulgulara uygun olarak sadece cerebrocerebral asimetri saptanan yeni doğanlarda pons, bulbus ve medulla spinalislerinde de histopatolojik değişikliklerin ileri dönemlerde tespiti yeni bir araştırma konusunu da gündeme getirmektedir.

Bu çalışmada, gebe sıçanlara gebeliğin 2.evresinde (E15) Carmustine uygulamasına bağlı olarak cerebellumda oluşan kortikal displazi'nin derecesini, atipik odakların varlığını, melatoninin nöroprotektif etkisiyle displazi derecesini düşürüp düşürmediğini saptamak ve olası pozitif etkisiyle klinikte kullanılabilirliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

İnsan cerebellumu postnatal 1,5- 2 yıl içinde güçlü bir nöronal proliferasyon ve migrasyon süreci geçirir. Bu süre içinde enfeksiyon, yaralanma, sitotoksik ajanlar ve radyasyona oldukça duyarlıdır [99]. Cerebral hemisferin malformasyonlarına ilişkin bir çok sınıflandırma yapılmıştır, ancak cerebellar malformasyonlara ilişkin kabul görmüş bir sınıflama bulunmamaktadır. Buna bağlı olarak cerebellar malformasyonlu hastalarda prognoz da iyi bilinmemektedir. Ayrıca, posterior fossada dejeneratif semptomlar gösteren çocuklarda dikkat çeken cerebellum anomalisinin atrofi mi, hipoplazi mi, yoksa malformasyon mu olduğunu ayırtetmek de oldukça zordur [64, 170, 206].

Çalışmalarla desteklenmiştir ki cerebellar nöronal sistemde meydana gelen gelişim bozuklukları ile şizofreni semptomları belirebilir. Bir çok motor ve işlevsel anormallikler şizofrenide de gözlemlenir. Bu da hasta çocuklar için risk teşkil eder [213]. Cerebellum yüksek kortikal fonksiyona sahiptir [71, 109]. Bunlardan biri de çalışma hafızasıdır ve şizofreni bunu bozar, sıklıkla frontal kortikal bölgelerde assosiyasyona zarar verir [21, 83]. Yetişkinlikte ve çocuklukta şizofreni başlayan hastalarda cerebellar kan akışı düzensizliği ve metabolizma bozukluğu çeşitli yayınlarda gösterilmiştir [10, 230]. Şizofreninin, nöronal gelişim döneminde meydana çıktığını destekleyen kanıtlar oldukça güçlüdür [25].

Özellikle cerebellar asimetri saptanan yeni doğanlarda bellek ve öğrenme testlerinin yetişkin dönemlerde deneysel olarak yapılması, deneysel şizofreni modellerine uygun tarzda değerlendirilmesi yeni araştırma konusu olarak ortaya çıkmaktadır. Bu konudaki araştırmalar oldukça yetersizdir [10, 21, 25].

Kortikal displazi hem pediatrik hem de yetişkin popülasyondaki epilepsi ile oldukça ilişkilidir [118]. Kortikal malformasyonlar sonucu oluşan nöbetlerin mekanizmaları hala iyi anlaşılabilmiş değildir. Çocukluk çağı epilepsilerinin % 25'inde altta yatan faktör kortikal gelişimle ilgili malformasyonlardır ve bu nedenle gelişme geriliği veya epilepsisi olan her pediatrik hastada kortikal malformasyonun gözden kaçırılmaması gerekmektedir [118]. Sekonder anormal kortikal malformasyonlar polimikrogyriayı içerir. Balon hücresiz fokal kortikal displazi, cerebral kortekste ve genellikle beyaz maddede gözlemlenirken beyinde anormal laminasyona da sebep olabilir. Bu kortikal displazik malformasyonlu çocuklar nöbet ve beraberinde mental retardasyonla karşı karşıyadır. Klinik olarak bu hastalıkları tariflemek için çeşitli sınıflamalara ihtiyaç duyulmuştur. Bu tarz anomaliler cobblestone (kaldırım taşı) lisensephaliler, kongenital kas distrofisi, hemimegalensephali ve heterotopi ile birlikte gözlemlenmektedir [22].

Bu çalışmada kortikal displazi modeli oluşturulduktan sonra olguların epileptik olup olmadıkları araştırma konusu edilmemiştir. Kontrol grupları 21. günde doğum gerçekleştirirken deney grubu olgularının 25- 26. günde dünyaya gelmesi Carmustine'nin alkilleyici etkisine bağlanmıştır. MSS malformasyonlu olan bebeklerin postmatur doğdukları da göz ardı edilmemelidir.

Histopatolojik bulgular eşliğinde göç hataları ve MSS gelişim geriliği göz önüne alındığında epileptik olguların da görülme olasılığı mevcuttur. Bu durum da ileri çalışmalarla yeni bir araştırma konusu olabilecek niteliktedir.

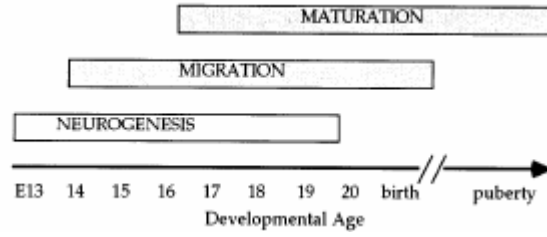
Gelişen sinir sistemindeki nöronların çoğu proliferere oldukları yerden olması gerektiği yerlere göç ederler [14, 20, 95, 166, 167]. Nöronal migrasyonla ilgili çalışmalar normal sinir sistemi gelişimiyle ilgili önemli mekanizmaları anlamada ve anormal göç hataları nedeniyle oluşan hastalıkların etiyolojisi ve nörolojik hastalıklara karşı yeni teröpatik yaklaşımlar oluşturmada önemlidir [166, 167]. Belirli zamanlarda göç eden hücrelerle ilgili postnatal davranışları gözlemlenen kuşlarda ve postnatal memelilerde nöroenezis ve nöronal migrasyonun devamı bugün bilinmektedir. Bu bulgular eşliğinde nörodejeneratif hastalıkların terapisinde hücre bazlı uygulamalar, nöronların veya hücrelerin hedef bölgeye doğru göçün önemini göstermektedir [14, 20].

Gelişen memeli cerebral korteksinde olması gereken nöronal oluşumlar önemli kompleks seriler içerir. Bir kez oluşan bu döngü kritik kesişmelerle duyuusal informasyondan tanıma fonksiyonlarına kadar birçok istemli hareket yapılmasında görev alırlar. Literatürde bildirildiği gibi normal kortikal döngü için nöron ve gliaların proliferasyon, migrasyon, maturasyon süreçlerini geçirmeleri gerekir [20, 167, 168, 169, 186]. Bu gelişimsel olayların senkrenizasyonu, nöronlar aracılığı ile beynin farklı bölgelerine sinyal iletimleri ile sağlanır. Kortikal nöronların çoğu, sıçanlarda cerebral ventriküllerin yanındaki proliferatif bölgelerden E14 ve E20 arasında meydana gelmektedir [18, 224].

Cerebral korteksin laminar yapısı RGH ile desteklenir ve göç eden nöronlar ile taslaklanır. Neokortekste nöronlar önce oluştukları yere yerleşirler ve yeni oluşan nöronlar eski nöronları iç tarafa doğru iter [166, 167]. Genelde kemirgenlerde migrasyon nöronal proliferasyondan 2- 4 gün sonra oluşmaktadır.

Kortikal nöronal farklılaşma; hücre olgunlaşması aksodendritik formasyonlarla ilgili kısa veya uzun bağlantılar, duyuusal bağlantı ve davranışsal

çıkışları sağlayan sinaptogenesi içerir. Eş zamanlı olarak kortikal glial hücreler ve damar ağı yetişkinliğe doğru olgunlaşır. Kemirgen neokorteksinde sinapsların çoğu (bir çok intrinsik ve ekstrensik kortikal bağlantıları) postnatal dönemin ilk 3-4 haftası içinde oluşur [88, 235].



Şekil 51.Kemirgen nöronal gelişim skalası [110].

Deney hayvanı olan sıçanlarda intrauterin nörogenesis süresince proliferasyon 11- 13.günlerde, migrasyon 13- 17 günlerde, maturasyon ise 16-17.günde başlamakta olup migrasyon P6, maturasyon ise postnatal 2. haftanın sonuna kadar devam eder (**Şekil 51**) [95, 110]. E15.günde servikal 5- 15 somit oluşumu; 1.faringeal arkus oluşumu; ektokoryonik kist, ekto plasenta ve allontoik kalıntının kaynaşması; periferik vitellusta ve diplotrofoblastta gerileme; Reichert's membran gelişiminin endodermden başlaması embriyonun dorsal kıvrılmaya devam etmesi söz konusudur [239].

Bu araştırmada, gelişimsel dönem dikkate alınarak nöronal migrasyonun en aktif olduğu ve maturasyon döneminin başladığı gün olan 15.gün alkilleyici ajan olan Carmustine uygulaması ve dramatik etkilerin derecesini düşüreceği düşünülen melatonin doğum gerçekleşene kadar her gün uygulanmıştır.

İnsanda 5. haftada pontin fleksürün ortaya çıkmasından sonra 4. ventrikülün ince bir tavanı ve lateral yerleşimli dorsal plakları görülür. 5. hafta boyunca alar plaklardaki hücreler proliferasyon ve pontin fleksürün oluşumu rombik dudakları

meydana getirir [196]. 4. ventrikül tavanında ve rombik dudaklardaki nöroepitelyal bölgeler germinal matriksin yerleştiği bölgelerdir. Cerebellumun hücreleri ve beyin sapı çekirdeklerinin çoğu bu bölgelerden oluşacaktır [84]. İnsanda sonraki 9- 13. haftalar arasında cerebellar korteksin Purkinje hücreleri ve derin cerebellar çekirdeklerin nöronları, germinal matriksten dışa doğru radyal şekilde göç etmeye başlar. Purkinje hücrelerinin kimliği ve göçü *Wnt3* de dahil birçok genin ekspresyonuna bağlıdır [187]. Bunun aksine, cerebellar korteksin granüler tabakasının nöronları rombik dudakların germinal bölgesinden tanjansiyel olarak cerebellar yüzeyin üstüne doğru göç ederler ve böylece sekonder germinal matriks gibi davranan geçici bir EGL oluşur [111, 123, 167, 168, 169]. EGL konsepsiyon sonrası 10. ve 11. haftalar arasında oluşur ve yaklaşık postnatal 15. aya kadar da var olmaya devam eder. EGL hücreleri proliferer olur ve granüler hücre nöroblastları homofilik Purkinje hücrelerinin oluşturduğu kümeler arasına doğru göç etmeye başlar, bu göç olayına Radyal glial lifler yardım eder ve sonuçta İGL oluşur [104, 123, 196]. Aynı zamanda cerebellar korteksin stellat ve basket hücreleri oluşur. Granül hücre canlılığı ve migrasyonu çeşitli genler tarafından desteklenmektedir Bunlar arasında en önemlileri *Pax6*, *Zic1* ve *Math1*'dir. Radyal gliaların korunması ise *Pax3* gen ekspresyonu ile sağlanmaktadır [84, 142, 143, 196]. Gelişmekte olan cerebellar meninkslerdeki mezenşimal hücrelerin de cerebellumun gelişmesine katkısı vardır. Örneğin; meninks hücreleri 6- hidrokسيدopaminle hasarlanırsa vermisin katlanması ve laminasyonu bozulur. Bu bozulma olasılıkla cerebellar korteksin glial yapı iskeletinin disorganizasyonuna bağlıdır. Glial yapı iskeletinin bozulma nedeni ise glia limitans eksterna yapısında da bulunan ekstraselüler matriksi stabilize eden meningeal-glial etkileşimin kaybıdır [155, 167, 168, 197].

Kemirgen cerebellumunda, prekürsör hücreler E11- 13. günde oluşur. Cerebellar gelişimin erken döneminde (proliferasyon fazı), öncelikle cerebellar korteksten çıkış nöronu olan Purkinje hücresinin nörogenezisi gözlenir. Bu hücreler radyal glial sistem boyunca rudimenter bölgeden germinatif zona uzanır. Bunu diğer bir cerebellum tabakası olan İGL izler [6, 7]. Reeler mutant farelerde yapılan klasik çalışmalarda gelişen cerebellumda tabaka formasyon hataları gösterilmiştir [40, 41, 42]. Kortikal nöronlar, tabakalar arası ve dendritik ağacın projeksiyonları arasında tüm yönlerde dağılır. Cerebellar gelişimi inceleyen nöroanatomik, hücresel ve Reelin’le moleküler kombine yapılan çalışmalar cerebellar organizasyon için model olarak önerilmiştir. Yetişkin cerebellar katmanlarının aksine perinatal sıçan cerebellumu dıştan içe EGL, MZ ve İGL olarak tanımlanmıştır [72].

Cerebellar alanın nerede lokalize olacağının erken dönemde saptanması, homeotik genlerin ekspresyonuna bağlıdır. Orta beyin ve ön-arka beyin ilk şekillenmesinin kontrolünü, nöroepitelyum içindeki potent, embriyo kökenli bir organizator yapı sağlamaktadır. Bu organizatör yapı, orta beyin-arka beyin sınırındaki istmik bir konstriksiyon bölgesinde lokalizedir ve “*m/h*” veya “*istmik organizatör*” olarak isimlendirilmektedir [101, 233].

Bu araştırmada, literatürle uyumlu olarak yeni doğan cerebellumunda EGL, MZ ve İGL tabakalanması tespit edilmiştir [72]. EGL, nöronal göç sonucunda ilkel stratum granulosum tabakasını (İGL) oluşturacak nöronları içermektedir. EGL tabakasının kalınlığı embriyonel gelişim periyodunun belirlenmesinde bir kriter olarak kabul edilmiştir. Her gruptan seri kesit alma yoluyla elde edilen ve aynı bölgeden geçen preparatlardan Image-Pro Express 4.5 (Media cybernetics, inc, USA) programı eşliğinde alınan ölçümler istatistiksel

olarak değerlendirilmiştir (**Şekil 28**). Değerlendirme sonucunda en kalın EGL tabakası Carmustine uygulanan grupta saptanmıştır. Kontrol, SF ve Melatonin-Kontrol grubunda EGL tabakası daha ince saptanırken, Carmustine+ Melatonin grubunda bu tabaka kontrollerden kalın, Carmustine grubundan ince saptanmıştır. Bu da embriyonal gelişim sürecine Carmustine'nin negatif etkisi ve bunun üzerine melatoninin pozitif etkisi olarak yorumlanmıştır.

Cerebellum ve gyrus dentatusun granüler hücreleri birkaç morfolojik ortak özelliği paylaşır. Ayrıca, her ikisi de fonksiyonları için bazı büyüme faktörleri ve sinyal iletim yollarının ekspresyonuna bağımlıdır [60]. Ancak, cerebellar ve hipokampal granüler hücreler glutamat reseptör alt tiplerini içermesi [141] ve gen ekspresyonu profili açısından oldukça farklılık gösterir ki bu özellikler iki hücre tipinin farklı fizyolojik roller oynadığının olası kanıtıdır. Bu benzer ancak aynı zamanda farklı özellikler sayesinde, bu iki granüler hücre tipi, proliferasyon ve maturasyonlarının düzenlenmesinden sorumlu intrinsik faktörlerin araştırılmasında ilginç modeller olarak kabul edilmiştir. Dentat ve cerebellar granüler hücrelerin ikisi de embriyogenezin geç dönemlerinde ortaya çıkar ve postnatal birinci haftada en üst seviyeye ulaşır [6]. Bazı araştırmalarda hipokampal granüler hücreler yaşam boyunca proliferasyona devam ettiği, ancak yaşlanmaya bağlı olarak proliferasyon hızı düştüğü belirtilmiştir [6, 115]. Oysa, cerebellar granüler hücrelerde genезis yaşamın ilk iki haftası içinde sona erer [7, 8]. İlginç olarak gen çalışmalarını cerebellar granüler hücre üretiminin maksimum olduğu dönemde onkogenез ve ribozomal protein senteziyle ilgili genlerin oldukça yüksek miktarlarda eksprese edildiğini göstermektedir [186].

MSS gelişiminde farklı iki bölgesi, cerebellum ve hipokampusun histogenezinde aynı özellikleri taşıyan hücreler olan granüler hücrelerin

embriyonal gelişim sürecindeki durumları güçlü bir araştırma konusudur. Bu konuda yapılacak olan çalışmalar sinir sisteminin evrimi, işleyişini ve hücresel boyuttaki ilişkilerin anlaşılmasında önemlidir.

Deneysel kortikal displazi modeli oluşturmak için çeşitli metotlar vardır. Bunlar arasında dondurma lezyonu [62, 91, 128], antimitotik bir ajan olan ve S fazında DNA'nın tek ipliğinin guanin nükleotidini metilleyen metilazomethanol asetat uygulanması [46, 78, 94, 98, 200, 218], radyasyon uygulaması [55, 112, 144, 181] ve antineoplastik ajanlardan nitrozoüre grubuna ait ve DNA alkilleyici özelliği bulunan Carmustine'in [22] hamilelik döneminde uygulanmasıyla oluşturulmaktadır. Benardete ve ark. [22] tarafından yapılan deneysel çalışmada gebe sıçanlara E15'de intraperitoneal Carmustine (1- 3- bis- chloroethyl- nitrosourea: BICNU) enjekte edilmiştir. P0, P28 ve P60. günlerde kontrol ve Carmustine uygulanan gruplarda spontan potansiyel elektrofizyolojik ölçümler yapılmıştır. Son olarak, piramidal nöronların fizyolojik özellikleri ve GABA tepkileri ile hücre kayıtları kontrol ve Carmustine uygulanan gruplarda incelenmiştir. Kortikal displazinin yavrulardaki karakteristik özellikleri; artan laminar organizasyon bozukluğu, sitomegalik nöronlar ve nöronal heterotropizm'dir. Displazik korteks genelde Cajal-Retzius hücrelerinden oluşan anormal hücre kümeleri ve immunohistokimyasal olarak gösterilebilen RGH'lerde bozulmalar içermektedir. 10µM bicuculine methiodide ile parsiyel GABA reseptörleri bloke edildiğinde displazik kortekste spontan epileptik deşarjlar saptanmıştır. İntrauterinal BICNU uygulanması yavrularda açıkça kortikal displaziye neden olmaktadır [22].

Bu çalışmada, daha kolay ulaşılabilir olması, maliyeti, diğer yöntemler kadar efektif sonuç vermesi nedeniyle antineoplastik ajan Carmustine tercih

edilmiştir. Gebelik döneminde Carmustine uygulaması sebebiyle oluşan kortikal displazi'nin yeni doğan sıçanların cerebellum gelişimi üzerine etkisi ve nöroprotektif ajan olan melatonin'in oluşan kortikal displazi üzerine olası pozitif etkisi histokimyasal, immünohistokimyasal, elektron mikroskopik ve biyokimyasal olarak gösterilmiştir.

Alkilleyici ajanlar, kloroetil türevi nitrozoüreler stabil olmayan bileşiklerdir ve fizyolojik koşullarda spontan olarak, alkilleyici ve karbamolleyici ara ürünlere dönüşürler [105]. Yağda eriyebilirliğinin çok yüksek, fizyolojik pH'da iyonizasyonun çok düşük olması nedeniyle Carmustine kan-beyin bariyerini ve plasental yolu rahatlıkla aşar [237].

İlacın pulmonar toksisite, hematolojik, gastrointestinal ve nefrotoksik yan etkileri vardır. Önemli yan etkilerinden birisi yüksek ateştir [22, 105]. Carmustine uygulaması yapılan gruplarda ilacın bir yan etkisi olan yüksek ateşi gösterebilmek için anal prob kullanılarak bilgisayarda Biopac Student Lab Pro 3.70 (1992-2004 Microsoft Corp. Model MP35 Build. O3.02.04) programında data alınmıştır. Bu datalar değerlendirildiğinde Carmustine uygulanmasıyla ortaya çıkan ateşin istatistiksel olarak anlamlı derecede yükseldiği saptanmıştır (**Tablo 2**).

Yeni doğanların ağırlıkları ölçülüp gruplara göre istatistiksel analiz yapıldığında en düşük doğum ağırlığına Carmustine grubu sahip olurken, Carmustine+ Melatonin grubundaki doğum ağırlığı; kontrol gruplarına yakın olarak saptanmıştır. Bu bulgular klinik olarak saptanan mental retardasyonlu bebeklerin postmatür ve düşük doğum ağırlığıyla doğmaları ile benzerlik göstermektedir (**Şekil 21**).

Carmustine'nin DNA ve RNA'yı alkileyen bir ajan olduğu ve bu özelliği nedeniyle de intrauterinal kortikal displazi yaptığı literatürde deneysel olarak

tanımlanmıştır. Bu etki gebelik döneminde X ışınına maruz kalan fetüs üzerinde meydana gelebilecek etkiye eş bir etkiyi göstermektedir. Ateşin yükselmesi fetüslerde kortikal displaziye neden olacak Carmustine'nin etkinliğinin göstergesi olarak değerlendirilmiştir. Carmustine ile yapılmış deneysel ve klinik vakalar üzerine çalışmaları destekleyen literatürler oldukça sınırlıdır [22].

Antioksidatif enzimler üzerine uyarıcı etkileri olması nedeniyle bir indirekt antioksidan olan Melatonin, hem deneysel hem de klinik uygulamalarda kullanılmaktadır [172, 180, 212]. Kullanımının yaygınlaşmasının nedeni çok düşük toksisiteye sahip olması, saf halde elde edilebilirliği ve maliyetinin ucuzluğudur [17, 36, 37, 79, 174]. Antioksidan özelliklerinin ötesinde, başka klinik durumlarda da test edilmiş ve başarıyla kullanılabildiği görülmüştür [36, 37]. Melatonin, tanımlandığı ilk dönemlerde transmeridyen uçuşlarda jet-lag etkisinin şiddetini azaltmak amacıyla yolcular tarafından kullanılmıştır [37]. Daha sonrasında ise bir uyku hapi olarak popülerite kazanmıştır [36]. Pek çok araştırmacının gerek deneysel gerekse klinik gözlemlerine dayanarak sundukları raporlar akciğer, beyin, deri ve renal kanserlerde melatoninin kanserli dokuda büyümeyi baskılayıcı bir etkisinin olduğunu desteklemektedir [24, 125]. Yakın zamanda gram-negatif bakteriyel infeksiyonlar ve solunum zorluğu sendromu bulunan yeni doğanlarda uygulanan tedaviye ek olarak melatonin verilmesinin başarı şansını oldukça yükselttiği görülmüştür [80, 81]. Bu her iki ciddi durumun da büyük miktarlardaki toksik serbest radikal üretimi ve bunun sonucunda meydana gelen doku hasarı ile bağlantılı olduğuna inanılmaktadır [81]. Ayrıca, serbest radikallerin ve bunlarla ilişkili reaktanların neden olduğu, yada patogenezin bir kısmında bu maddelerin negatif etkisi olduğu düşünülen bazı hastalıklar rapor edilmiştir [174]. Bu toksik reaktanlar tarafından meydana

getirilen moleküler hasar genel olarak “oksidatif stres” olarak adlandırılır ve fonksiyonel olarak zarara uğramış bu moleküllerin birikimi sonucunda fizyolojik bozulma ve buna bağlı hastalık gelişimi meydana gelir. Daha da önemlisi melatonin hidrojen peroksiti direkt olarak ortamdan temizler, endojen bir antioksidan enzim olan glutatyon peroksidaz aktivitesini stimüle eder, pek çok koruyucu enzimin gen ekspresyonlarını düzenler ve lipid peroksidasyonunu azaltır [17, 79, 172, 173]. Serbest radikalleri temizleme yeteneğinin yanısıra melatoninin nötrofil birikimini azaltıcı bir etkisi olduğu da bulunmuştur [175]. Özetle, melatoninin oksidatif hasarı azaltmadaki yüksek başarısı hem reseptörden bağımsız hem de reseptör aracılı süreçleri içermektedir. Direkt serbest radikal çöpcülüğüne ek olarak, antioksidatif işlevleri klasik antioksidanlar ile birlikte gösterdiği sinerjistik etkiye, benzersiz intraselüler dağılımına, ikinci ve üçüncü kuşak metabolitlerinin de aynı zamanda etkili çöpcü olduğu gerçeğine, antioksidatif enzimlerin gen ekspresyonlarını ve aktivitelerini indüklemeye yeteneğine, mitokondriyal seviyede serbest radikal oluşumunu azaltmasına ve henüz tanımlanamayan diğer etkilere bağlıdır [17, 79, 80, 172, 180].

Daha önce ekibimiz tarafından yapılan bir çalışmada, deneysel olarak pinealektomi yapılmış ve epileptik nöbet geçirmiş gebe sıçanların yeni doğanlarında melatoninin olumlu etkileri gösterilmiştir [219, 222]. Çalışmada pinealektomize edilen sıçanlar kontrollü gebe bırakılmış ve gebeliklerinin 13. gününde deneysel olarak Penicilin- G ile grand mal epileptik nöbet geçirmeleri sağlanmıştır [219, 222]. Nöronal kök hücre markeri olan Nestin ile işaretlenen deney grubunda hücre sayısının kontrol ve tedaviye göre daha fazla sayıda olması, bu olguların gelişimin erken döneminde olduğunu göstermiştir.

H&E boyama yapılmış kontrol, SF ve Melatonin- Kontrol preparatlarında EGL, MZ ve İGL oldukça belirgindir ve bu üç tabakada da yer yer interselüler aralıklar görülmüştür. İnterselüler aralıkların bulunması maturasyonun devamını göstermektedir. EGL'nin azalması ve hücrelerin radyal şekilde dizilmiş olması radyal göçün devamını göstermektedir. Yetişkinde tek sıralı uniform yapıdaki Purkinje hücre tabakası yeni doğanda 3- 4 sıralı bir imaj vermektedir. Cerebellar nükleuslara ait kesitlerde multipolar nöronların varlığı saptanmıştır. Kapiler damarlar substantia alba'da belirgin olup yetişkindeki stratum moleculare daha oluşmamıştır. Carmustine grubunda ise EGL hücre tabakasının kontrol gruplarına oranla daha kalın olduğu saptanmıştır. MZ geniş, SVZ daha kalın olarak gözlemlenmiştir. EGL ve MZ arasında diğer gruplara oranla daha fazla, geniş ve belirgin interselüler aralıklar mevcuttur. 7- 8 sıralı Purkinje hücre tabakası saptanmıştır. Sulkus etrafında göçün devamını gösteren radyal dizilim saptanmıştır. Halen göçün ileri dönemde devam edebileceğini gösteren hücre popülasyonu mevcuttur. MZ'deki Purkinje hücre morfolojisi oldukça yaygın ve İGL'nin substantia alba'ya bakan kısmında da benzer perikaryon varlığı saptanmış ve bu da göç hatası olarak değerlendirilmiştir. MZ ve İGL zonlarında damarlarda dilatasyon mevcuttur. Cerebellar nükleuslar belirgin fakat, sulkusların belirgin olmadığı ve folia görünümünün oluşmadığı görülmüştür. Sulkus derinliği az bulunup gelişimin geri kaldığı saptanmıştır. EGL'de yer yer incelme ve kalınlık deney grubuna oranla daha azalmıştır. Folia oluşumunda sulkusların derinliği SF grubuna oldukça yakındır. MZ hücreleri dağınıktır, ancak kontrol grubuna göre geniş bir alanı kapsamaktadır. EGL'de göç eden hücrelerin radyal dizilimleri mevcuttur. İGL'de tam bir hücre popülasyonu oluşturulmamıştır. İnterselüler aralıklar Carmustine grubuna göre azalmış olarak saptanmıştır. EGL'deki

hücrelerin heterojenitesi mevcut olup Purkinje hücre perikaryonlarının görünümü normale yakın yapıda saptanmıştır.

Toluidin Boyama uygulanan ışık mikroskopik kesitlerde ise Kontrol, SF, Melatonin- Kontrol grubunda H&E boyamadaki bulgulara eş bulgular saptanmıştır. Carmustine grubunda MZ'deki bazı hücrelerde multipolar nöron maturasyonu yerine atipik perikaryonlara sahip hücreler tespit edilmiştir. EGL'de mitotik figürlerin yoğunluğu görülmüştür. Bu mitotik figürlü görünüm MZ'deki Purkinje hücrelerinin yan komşuluğunda da mevcuttur. Mitotik figürler EGL ve MZ arasında muhtemel göç eden hücrelere aittir. Bu hücrelerin düzensiz, geniş apikal dendritleri saptanmıştır. Hücre nükleusların nükleoplazmaya oranı yüksek olarak saptanmıştır. Cerebellar nükleuslarda multipolar nöron yerine MZ'deki hücrelere benzer konumdaki dev balona benzer "Balon hücreler" saptanmıştır. Carmustine+ Melatonin grubu MZ'deki hücreler heterojen olarak dağılmışlardır. Nadiren periferik yerleşimli nükleuslara sahip hücrelere de rastlanmıştır. İnterselüler aralıklar kontrollere yakın şekilde gözlemlenmiştir. EGL ise kontrol gruplarına göre daha geniş saptanırken Carmustine grubuna göre daha incelmış olarak görülmüştür bu da göçün devam ettiğinin belirtisi olarak kabul edilmiştir. EGL de mitotik figürlü hücreler Carmustine grubuna göre daha az saptanmıştır. Bu bulgular literatürle uyumludur [166, 168, 179].

Geçtiğimiz 15 yılda MSS gelişimi ve hastalıklarında glia fonksiyonlarının altında yatan mekanizmaları aydınlatmaya yönelik yoğun çaba sarfedilmiştir. Glial hücreler yapısal destek dokunun elemanları olarak kabul edilmekteydi. Günümüzde bu hücrelerin nöronal gelişimde anahtar rol oynadığı düşünülmektedir. Astrositler nörogenezis, nöronal migrasyon, proliferasyon ve diferansiyasyon, nöronal sinyal, sinaps oluşumu, kan- beyin bariyerinin

organizasyonu ve aksonal uzama gibi beyin gelişimiyle ilgili çok sayıda süreçte katkıda bulunan makroglial hücrelerdir [69, 73, 74, 122, 145, 156, 168]. Son yıllardaki araştırmalar astrositlerin nöronal kök hücre olma potansiyellerine dikkat çekmektedir [59, 67].

GFAP, 52 KD boyutunda bir ara filamenttir ve glial hücrelerden astrosit ve ependimal hücrelerde görülür. PSS'de ise GFAP Schwann hücreleri, enterik glialar ve insan duysal ganglionlarının satellit hücrelerinde gösterilmiştir [108]. Gelişim sırasında gözlemlenen ve nöronların ilgili yerlerine göç edebilmesini sağlayan RGH'ler aslında astrositlerin progenitör hücreleridir [52, 86].

Bu araştırmada, cerebellum gelişimi sırasında nöronal göçte rol oynayan RGH'lerin işaretlenmesinde GFAP immünpozitif reaksiyon vermiştir. Kontrol, SF ve Melatonin- Kontrol gruplarında EGL'de GFAP (+) ve (-) hücre popülasyonu belirgin görülmüştür. MZ'de Purkinje hücrelerinin komşuluğundaki küçük nükleuslu hücrelerin genelde GFAP (+) oldukları saptanmıştır. İGL'de diğer tabakalara göre daha az immünreaktivite görülmüştür. Dendrit benzeri uzantılara sahip hücrelerin EGL'den azalarak İGL'ye doğru uzantıları gözlemlenmiştir. İGL ile EGL arasında longitudinal olarak paralel seyreden GFAP (+) uzantıların RGH ile morfolojik olarak uygun olduğu ve GFAP (+) hücre ve uzantılarının EGL'yi dışarıdan sınırladığı gözlemlenmiştir (**Şekil 34-35-36**). Carmustine grubunda GFAP (+) reaksiyon veren RGH az miktarda saptanmıştır. EGL'de GFAP (+) reaksiyon veren yapılar yok denecek kadar azdır ve daha çok MZ'de gözlemlenmiştir. Uzantıların transvers kesitleri de preparatlarda görülebilmektedir (**Şekil 37**). Carmustine+ Melatonin grubunda ise EGL daralmış olarak görülmüştür, ancak GFAP (+) hücrelerin çoğunlukla kesit düzleminden transvers geçen uzantıları da izlendiğinde reaksiyonun az olduğu görülmüştür. Membrana

glia limitans eksterna'nın halen oluşum aşamasında olduğu saptanmıştır. Buna karşın membrana glia limitans perivascularis oluşumunu tamamlamış ve belirgin bir biçimde gözlemlenmiştir. EGL'de GFAP (+) reaksiyon olduğu görölmüş olup göçün devam ettiği saptanmıştır. Bu grupta Carmustine grubuna göre daha fazla immünreaktivite gözlemlenmiştir (**şekil 38**).

Bütün bu bulgular eşliğinde Carmustine etkisiyle Radyal glial yapının hasarlandığı ve bu hasarın derecesinin melatonin tedavisi ile gerilediği saptanmıştır.

Synaptophysin hemen hemen tüm nöronlarda presinaptik veziküllerde bulunan bir integral membran glikoproteinidir. Bu glikoproteini işaretleyen antikorlar, synaptophysinin aktif aminoasit dizininden seçilen hidrofilik bir peptid sekansı ile reaksiyona girer. Bu marker nöronlar ile ilişkili sinapsları işaretler.

Kontrol, SF ve Melatonin- Kontrol gruplarında synaptophysin immünreaktivitesi EGL'de saptanmamıştır. MZ ve İGL'de yoğun ve belirgin olarak reaksiyon gözlemlenmektedir. Ayrıca, EGL'nin MZ'ye bakan yüzeyinde oldukça yüksek immünreaksiyon mevcuttur. Carmustine grubunda ise immünreaktivite kontrol gruplarına oranla aynı tabakalarda daha az gözlemlenmiştir. Carmustine+ Melatonin grubunda deney grubuna göre daha yüksek immünoreaksiyon görülürken bunun kontrol gruplarına oranla daha az olduğu tespit edilmiştir. EGL'nin MZ komşuluğuunda immünreaktivitesi daha yoğun görölmektedir (**şekil 39**).

Bu bulgulara göre Carmustine uygulamasının sinaptogenezi geri bıraktığı bunun da embriyonik erken dönemle uyumlu olduğu saptanmıştır. Melatonin tedavisi alan grupta ise kontrol grubu kadar olmasa da deney grubundan daha yoğun immünreaktivite saptanmıştır.

Tek bir nöronal kök hücre MSS'yi meydana getiren nöronlar, astrositler, oligodendrositleri oluşturabilme kapasitesindedir. Bu karakteristik özelliklerinden ötürü gerek temel gelişimsel biyolojiyi anlamada gerekse beyin hasarında olası terapötik uygulamaları önerme açısından nöronal kök hücreler ve nöral progenitör hücrelere ilgi her geçen gün artmaktadır [50, 56, 152].

Kemirgenlerde Nestin ilk olarak E7,75. günde proliferen MSS'ne ait bölgelerde eksprese olmaktadır. E10,5 günde Nestin, nöral tübün glial hücreleri dahil tüm hücrelerinde eksprese edilmektedir. E15,5. günden başlayarak yeni doğanda cerebellum, VZ, SVZ'de ekspresyonu devam etmektedir. Nestin geni MSS kök/progenitor hücrelerinde hem embriyoda hem de yetişkinde eksprese olabilmektedir. Nestin ekspresyonu yeni doğan beyninde zayıflar, yetişkinde ise SVZ'de görülmeye devam eder [50, 132, 232].

İki majör germinal tabaka olan VZ ve SVZ ön beyindeki bütün nöron ve glial hücrelerin sayısal olarak arttığı bölgelerdir. Bu, germinal tabakadaki nöronal kök hücrelerinden hücre kümelerinin farklılaştığının bilinmesinden itibaren önemli ve güçlü araştırma konusudur [75, 234]. Bu germinal tabakadaki nöron topluluğunun embriyonik periyotta farklılaşma kapasitesinde olduğu saptanmıştır [240]. Lateral hemisferlerin SVZ'lerinde progenitör hücreler ve gyrus dentatustaki progenitor hücreler hayvanın hayatı boyunca çoğalabilirler [75, 234].

Fokal iskeminin kortikal ve subkortikal gliosis'e neden olduğu saptanmasına rağmen, SVZ'deki hücre çoğalması tamamen araştırılmamıştır. Memeli beyninde hayat boyunca nöronlarda ve gliada artışa neden olan SVZ sürekli olarak multipotent progenitör hücreler içerir. Bunlar granüler ve periglomerular nöronlara farklılaşırlar. SVZ'den önbeyine olan progenitör göç, ikinci postnatal

haftayla azalır, fakat fokal beyinsel iskemiye tepki olarak tekrar çoğaldığı belirtilir [75, 122].

Olgun astrositler ve oligodendrositler beyin hasarına tepki verme yeteneğini kaybetmezler. Mikroglia hücreleri aynı zamanda gliosis'e katılırlar. Nörospherler denilen küremsi hücre kümeleri SVZ'de meydana gelir. Bu nörospherler yeni nöronlar, astrositler ve oligodendrositler oluşturabilme kapasitesindedir. Ayrıca, kemirgen SVZ hücreleri kültür yapıldığında bu hücrelerden birçoğu farklılaşarak nöronlara dönüşür [75].

Pre ve perinatal periyotta hipoksi, iskemi ve diğer beyin hasarları belki de yapısal değişim ve düzensizliğe neden olacak nöronal migrasyon hatalarına yol açmaktadırlar. İnsan neokorteksinde bu malformasyonlar ender olarak mental retardasyon, motor disfonksiyon ve terapiye dayanıklı epilepsiye neden olabilir [128].

Bu çalışmada, deney grubu cerebellumlarında Nestin (+) hücre sayısının kontrol gruplarına kıyasla yüksek olması Carmustine uygulanan gruplarda nöronal gelişimin daha erken dönemde kaldığının göstergesidir. Carmustine uygulanıp melatonin tedavisi alan grupta ise Nestin (+) hücre sayısı kontrol grubundan fazla, fakat Carmustine uygulanan gruba göre istatistiksel olarak daha az saptanmıştır (**Şekil 40-41**). Bu, kontrol gruplarına daha yakın olduğunun göstergesidir. Daha ileri çalışmalarla bu etkilerin sonraki evrelerde kognitif etkileri araştırma konusu olabilecek boyuttadır.

TGF- β 'lar hücre büyümesinin kontrolü, diferansiyasyon, inflamasyon ve apoptoziste rol alan, kemotaktik, antiproliferasyon ve ekstraselüler matriksin yeniden yapılanmasını düzenleyici etki gösterdiği düşünülen pleotrofik sitokinlerdir [136]. İmmün ve nöral hücrelerde etki gösterebilme kapasitesinde

olan TGF- β 1, doku hasarının ve tamir mekanizmasının düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır [221]. TGF- β 1 kültüre edilmiş nöronları hipoksik, toksik peptit- aracılı, eksitotoksik, apoptotik ve metabolik hasardan korur [114, 160, 161]. In vivo olarak rekombinant TGF- β 1 uygulaması veya TGF- β 1 geni verilmesi hayvanları potansiyel iskemik, eksitotoksik ve oksidatif strese bağlı beyin hasarından korur [184]. TGF- β 1, aynı zamanda erişkin beyninde aşırı nörit gelişimi, hücre migrasyonu, sinaptik plastisite gibi fizyolojik olaylara ve cerebral iskemiye de aracılık eder [90].

Sinyal molekülü karakterinde olan TGF- β 1, MSS hasarında hızla ve kronik olarak artar. Hasar bölgesindeki astroglial hücreler reaktif hale gelir, hipertrofiye uğrar ve glial skar oluşumuna neden olur. Bu aksonların rejenerasyonuna engel oluşturmaktadır. MSS hasarını takiben astrositler tarafından TGF- β 1 düzeyleri dramatik olarak yükseltilir, bu olay glial skar oluşumuyla direkt ilgilidir, ancak fizyolojik ortamdaki yerine ilişkin yayın nispeten azdır [26, 159].

Nöron- glia etkileşiminde ve özellikle de astrosit diferansiyasyonu sırasında TGF- β 1 yeni bir mediyatör olarak dikkat çekmektedir. TGF- β 1 reaktif astrositlerden GFAP oluşumunu uyarmaktadır. GFAP reaktif astrositler için bir marker fonksiyonu görür; ancak aynı zamanda aksonal rejenerasyona katkıda bulunan ekstraselüler matriks molekülleri için de diagnostik bir markerdir [133,137]. Son zamanlarda TGF- β 1 knockout farelerde yapılan çalışmalarda laminin ekspresyonunun azaldığının gösterilmesi ekstraselüler matriks oluşumunda TGF- β 1'in rolünü de aydınlatmıştır [33].

TGF β 'ların yukarıda sayılan etkilerinin yanı sıra embriyolojik gelişim proseslerini de düzenlediği düşünülmektedir. Çünkü, embriyogenezis sırasında yaygın olarak eksprese edilirler. Yapılan çalışmalarda postnatal ve erişkin fare

beyninde koroid pleksus, hipokampus, gyrus dentatus ve Purkinje hücrelerinde TGF- β 2 sentezlediği saptanmıştır [47, 67]. Ayrıca, postnatal dönemde EGL ve İGL tabakasındaki immatur cerebellar nöronlarda da TGF- β 2 eksprese edildiği bildirilmiştir [47, 67]. EGL’de postnatal 10. günde TGF- β 2 artmakta ve daha sonra düşüş göstermektedir. TGF- β 2’nin aksine cerebellar granüler hücrelerde TGF- β 1 mRNA’sı gösterilememiştir. TGF- β 3 ise postnatal beyinde yaygın olarak, ancak çok düşük düzeylerde eksprese edilir [47]. TGF- β 1’in erişkin sıçanlarda hem granüler hem de Purkinje hücrelerinde eksprese olduğu sonraki yıllarda gösterilmiştir [130]. Gelişimsel süreçlerin nöron- astrosit ilişkisi üzerine etkisi incelendiğinde, E14’te yaban tip farelerden alınan genç nöronların astrosit diferansiyasyonunu tetikleme kapasitesinin E18’deki farelerden elde edilenlerden daha yüksek olduğu görülmektedir. RT- PCR çalışmaları TGF- β 1 transkriptlerinin yaşlı nöronlara oranla genç nöronlarda sentezlendiğini göstermektedir, bu bulgu astrosit diferansiyasyonunu indüklemeye konusundaki yetersizliğin TGF- β 1 sentez ve salıverilmesindeki bozukluktan kaynaklandığını düşündürmektedir [52]. E14’te genç nöronlarda TGF- β 1 mRNA transkriptleri ve proteini gösterilmiştir ve bu bulgu bugüne kadar var olan ve TGF- β 1’in sadece hasarda ortaya çıkan astrositik bir sitokin olduğu varsayımına ters düşmektedir [30]. Gelişimini tamamlamış beyin dokusunda TGF- β 1 immünoreaktivitesi çok zor gösterilmektedir. E15’teki beyin dokusunda TGF- β 1’in biyoaktif olarak kendisi ve mRNA’sı gösterilmiştir [67]. Bu bulgu TGF- β 1’in MSS gelişiminde rolü olduğunu desteklemektedir.

TGF- β 1’in embriyonik erken dönem nöronlarda sentezlendiğini gösteren başka bir çalışmada ise hipotalamik nöronlardan salıverilen TGF- β 1’in kültüre edilmiş sıçan astrositlerindeki oksitosin reseptörlerini modüle ettiği gösterilmiştir

[139]. Aynı çalışmada E18'deki farelerden alınan yaşlı nöronlarda TGF- β 1 ekspresyonu gösterilememiştir [139]. Ayrıca, kemirgenlerde E17. gündeki ve yeni doğan dönemdeki kortikal nöronların TGF- β 1 transkriptlerini eksprese etmediği de gösterilmiştir [57, 229].

Nöronal diferansiyasyonu takiben TGF- β 1 sentez ve salıverilmesi azalır ve bu azalma GFAP gen promoterinin aktivasyonunda bir bozuklukla birlikte seyreder. 3 günlük ko-kültürdeki E14 ve E18 nöronlarda GFAP gen promoterinin indüklenmesi bozulmuştur. Bu bulgular, in vivo nöronal maturasyonla uygunluk göstermektedir. Farede nörogenezisin pik yaptığı E14± 16. günlerde nöronların birçoğu oldukça proliferatif özelliktedir, oysa E18'de bu nöronların çoğu farklı diferansiyasyon yollarına çoktan geçiş yapmıştır. Nöronal maturasyonu TGF- β 1 sentez ve salıverilmesindeki down- regülasyon izler. MSS'de TGF- β 2/ 3 ekspresyonu daha geç evrelerde gözlenmektedir [57, 67, 229]. Bu gözlem nörogeneziste farklı TGF- β izoformlarının değişken ve tamamlayıcı rolü olduğunu düşündürmektedir.

Gelişimsel dönemde cerebellar nöronlardaki apoptozisin regülasyonu TGF- β 1 ile sağlanır, bu sitokinler zamana ve lokalizasyona bağlı olarak üretilmelidir. İmmatür cerebellar granüler nöronlar postnatal P3. ve P13. günler arasında TGF- β 2 mRNA'sını eksprese eder. Postnatal ekspresyon yaklaşık P10'da pik yapar ve en fazla EGL'de gözlenir, EGL'de hem proliferasyondaki hem de postmitotik dönemdeki nöronlarda TGF- β 2 mRNA pozitif boyanır. TGF- β 2 ve TGF- β 3 protein ekspresyonu daha çok diferansiyasyon halindeki nöronların bulunduğu bölgeler, RGH ve uzantılarında bulunur [67]. TGF- β 1 tarafından sağlanan nöroproteksiyonda antiapoptotik BCL- 2 protein ailesinin üyeleri olan BCL- 2 ve BCL- xL'in upregülasyonu rol oynamaktadır [160].

Bu çalışmada ise kontrol gruplarına ait immunohistokimyasal TGF- β 1 boyamada MZ'deki Purkinje hücre perikaryonlarının pozitif reaksiyon verdiği görülmüştür. Ayrıca, çok az sayıda TGF- β 1 (+) hücrenin İGL'de olduğu saptanmıştır. Carmustine verilen deney grubunda MZ'ye yayılan TGF- β 1 (+) hücreler kontrole oranla daha az immunoreaksiyon vermektedir. İGL'deki bazı hücrelerde yine TGF- β 1 (+) reaksiyon saptanmıştır. Carmustine+ Melatonin grubunda ise TGF- β 1 (+) reaksiyonun genelde MZ'deki hücrelerde yoğunlaştığı görülmüştür (**Şekil 42**). Bu bulgular, literatürle uyumlu olup TGF- β sentezi, embriyolojik gelişim sırasında üstlendiği rol, nöroprotektif görevi, nörodejeneratif mekanizmadaki düzenleyici rolü, glial hücrelerde sentezlenmesi ve glial hücreler ile iskemi reperfüzyon, inme olgularında üstlendiği roller güçlü araştırma konularıdır. İleri çalışmalar yapılmasına ihtiyaç vardır.

Nöral gelişme sürecinde “programlı hücre ölümü” hemen hemen tüm nöron popülasyonlarında gelişmenin çeşitli evrelerinde doğal olarak oluşan hücre ölümü anlamında kullanılır. Bu terim “apoptozis”in tam sinonimi değildir. Apoptozis ile hem gelişimsel hücre ölümü sırasında, hem de hastalık ve hasar durumunda tetiklenen belirli bir hücre ölüm mekanizması anlatılmaktadır. Dolayısıyla hücre ölümünü başlatan pek çok tetikleyici olabilir. Apoptozis, gerekli olmayan hücrelerin komşu hücreleri hasarlamadan ve inflamatuvar bir yanıt oluşturmadan eliminasyonunu sağlar. Daha önce hücre ölümünün sadece fizyolojik formu olduğu düşünülmese de bugün patolojik hücre ölümüne de aracılık ettiği bilinmektedir [146].

Apoptotik hücre ölümünün altında yatan moleküler mekanizmalar evrimleşme sürecinde korunmuş gibi görünmektedir [9, 28, 146]. Apoptozisin

düzenlenmesindeki karışıklığı ve kompleksliği aydınlatmaya daha yeni başlanmıştır.

Hücre proliferasyonu, diferansiyasyonu ve ölümü mekanizmaları gibi hücrenin kaderinin kontrolü ile ilgili olaylar nörobiyolojinin önemli konularıdır. Yapılmış çalışmalar nöroeneziste ve hücre kaderine karar veren hücresel etkileşimde, nörotropik faktörlerin önemini vurgulamaktadır [28, 208, 228]. “Yönlendirici” ve “izin verici” faktörlerin ve sinyal iletim yollarının tanımlanması, bu biyolojik sürecin daha iyi anlaşılmasını kolaylaştırmak yanında beynin nörodejeneratif ve diğer hastalıklarında koruyucu tedavi ve hücre replasmanı stratejilerinin gelişmesine de yardımcı olacaktır [28, 208, 228]. Son zamanlarda bu görüşü destekleyen en önemli bulgu TGF- β 1 knockout farelerde kortikal gelişimde şiddetli bir bozulmanın ve nöronal ölümde ve mikroglioziste yaygın bir artışın gözlenmesidir [33, 85].

Bu araştırmada Kontrol, SF ve Melatonin- Kontrol gruplarına ait yeni doğan cerebellumları makroskopik olarak Carmustine ve Carmustine+ Melatonin grubuna göre daha büyük görülmüştür. Bu da yüksek apoptozis hızına bağlanmıştır.

Hücre proliferasyonu nasıl ki mitoz ile belirlenmekte ise belirli bir dokuda olması gereken hücre sayısı da apoptozis ile belirlenir [19, 49]. Gelişmekte olan sinir sisteminde apoptozis, doğal hücre ölümünün sonucu oluşan gerekli ve istenen bir durumdur. Doğal hücre ölümü yoluyla hatalı sinaps yapan veya hedefine ulaşamayan nöronların etkili bir şekilde yok edilmesini sağlar [77]. Heterotopiler, şizensefali, miyelomeningosel gibi pek çok konjenital beyin malformasyonları olasılıkla zayıf organize edilmiş ve/veya tam olmayan apoptozisle ilişkilidir. Radyasyon veya çeşitli kemoterapötik ajanlarla kanser

tedavisi sırasında bilinçli olarak apoptozisin hızı artırılır. Kanserlerin apoptozisin kuralına göre gerçekleşmemesinden kaynaklandığına inanılmaktadır [19, 45,49]. İnsanda görülen bir çok tümörlerde normalde bir büyüme baskılayıcı faktör olan p53'ün mutasyonları gözlenmektedir [63]. Erişkin sinir sisteminde nöronların çoğu sessiz kalma, yaşlanma ve ölüm süreci yaşar. Erişkin beyinde nöronal ölümün istenmeyen ve uygunsuz bir şekilde gelişebildiğinin göstergesi nörodejeneratif hastalıklardır. Bu hastalıkların apoptotik yollarla ilgili genlerde otozomal resesif defektlere bağlıdır [34, 119].

Embriyonik kemirgen cerebral korteksinde apoptozise giden hücrelerin tek tip ve yaygın bir görüntüsü vardır. Apoptotik hücre ölümü E14-16 arasında pik yapar ve E10'da ve erişkinde hücre ölümüne hemen hemen rastlanmaz. Postmitotik nöron içeren bölgelerde (marjinal tabaka, kortikal plak ve ara tabaka) bir çok ölmekte olan hücre gözlense de ölmek üzere olan hücrelerin çoğu proliferatif zondadır. Subplak ve kortikal plak arasındaki sınır bölgede apoptozise uğrayan bazı büyük nöronların subplak nöronlar olduğu düşünülmektedir [5]. Embriyonik korteksin proliferatif zonunda hücre ölümündeki artışın hızlı olmasının (ortalama yaklaşık % 50) nedeni açık değildir, ancak maksimum hücre ölümü döneminin (E12-E16) kabaca tüm terminal postmitotik nöronların olduğu bir dönem olan nöronogenetik intervale denk gelmesi oldukça ilginçtir [39]. Buna benzer bulgular insan fetüslerinde de gösterilmiştir [5]. Çalışılabilen en erişkin fetüslarda (23 haftalık) apoptotik hücreler esas olarak subplağın derin bölgelerinde bulunur. Kemirgen embriyolarında olduğu gibi insan embriyolarında da kortekste programlı hücre ölümü en çok proliferatif zonda belirgindir. Bunların diferansiye olmuş hücreleri mi yoksa olmamış hücreleri mi temsil ettiği açık değildir. Apoptotik hücrelerin kortikal plakta belirli bir pozisyona ulaşmakta

yetersiz kalan ve dolayısıyla migrasyondan önce elimine edilen postmitotik hücreleri temsil ettiği varsayılmıştır [198]. Ancak proliferatif zonda bir hücrenin daha sonra hayatta kalıp kalmadığını belirleyen kesin özelliklerin neler olduğu bilinmemektedir. Gelişmekte olan korteksin postmitotik bölgeleri arasında hücre ölümünün en fazla gözlemlendiği bölge subplaktır ve burada proliferatif zonla kortikal plak arasındaki tabakayı işgal eden geçici bir nöron popülasyonu bulunmaktadır [5]. Bu hücrelerin hemen hemen hepsi postnatal hayatın erken dönemlerinde apoptozisle ortadan kaldırılır [164].

Postnatal hayatın ilk haftalarında cerebellumda mature olmuş granüler hücre tabakasında belirgin bir hücre kaybı vardır. EGL'nın mitotik ve postmitotik bölgelerinde çok sayıda granüler nöronda DNA fragmentasyonu oluşur, bu olay en fazla postnatal 7.günde gözlenir. Apoptozisin nedeni granüler nöron popülasyonunun hedef hücreleri olan Purkinje hücrelerine belli oranda uygun sayıda olmasının sağlanmasıdır. İnsan cerebellumun embriyonal gelişiminde ise kritik dönem 22-25 haftalar arasındadır. Bu dönemde cerebellumda oldukça yüksek oranda apoptotik hücreye rastlanır [147]. Sıçan yeni doğanında P7 de EGL hücrelerinde yüksek apoptozis hızı vardır. Bu süreç P0 da oldukça yüksektir. İnsanda ise doğum sonrası 4. haftanın sona kadar (P30) sürer. Dolayısıyla deneydeki yeni doğan sıçanların kontrol gruplarında apoptotik hücre görmek normal ve embriyonal gelişimin bir sonucudur.

Gelişim periyodunun normal fizyolojik bir mekanizma olan apoptozis bu çalışmada TUNEL metodu kullanarak immunohistokimyasal olarak saptanmıştır. Kontrol gruplarında TUNEL (+) hücrelerin varlığı gelişim dönemine ait fizyolojik bir süreç olarak kabul edilip değerlendirilmiştir. Carmustine uygulanan grupta TUNEL (+) hücre sayısı kontrol gruplarına kıyasla yüksek olduğu istatistiksel

olarak anlamlı bulunmuştur. Melatonin ile tedavi edilen grupta da Carmustine grubuna göre daha az, kontrol gruplarına göre daha yüksek olarak saptanmıştır (**Şekil 43**). Gelişen cerebellum dokusunda gelişimin fizyolojik olarak normal kabul edilen apoptozisin alkilleyici ajan olan Carmustine'nin etkisiyle arttığı, melatonin ile tedavi edilen grupta oluşan kortikal displazinin derecesini düşürüp apoptotik hücrelerin sayısını istatistiksel olarak düşürdüğü saptanmıştır (**Şekil 44**).

Carmustine grubunda görülen yüksek apoptotik hücre sayısı ve dağınık TGF- β 1'in az immunoreaktivitesi birlikte düşünüldüğünde TGF- β 1'in nöroprotektif etkinin azalmasına bağlı apoptotik süreçte tetiklenme yapabileceğini düşündürmektedir.

Elektron mikroskopik bulgular Kontrol, SF ve Melatonin- Kontrol gruplarında Purkinje hücrelerine özel nöron perikaryonu ile birlikte büyük ve küçük nöron perikaryonları da saptanmıştır. Bu nöronlarda ökromatik nükleuslar belirgindir ve gruplar oluşturmıştır. İnterselüler aralıklar gözlemlenmiştir. Aksonal filopodia, dendritik uzantılar ve bunların yanısıra glial uzantı kesitleri hücrelerle birlikte görülebilmektedir. Bu da gruplara ait örneklerin sinaptogenezisin maturasyon döneminde olduğu sonucuna varılmıştır. Hücre perikaryonları komşuluğunda bulunan aksosomatik sinapsların yanısıra uzun, geniş sitoplazmik kesitlerde muhtemel RGH'lerin migrasyona yardım ettikleri göstermektedir. RGH'lerin nükleoluslarının nükleus içerisinde geniş yer tuttuğu görülmüştür. Kan- beyin bariyeri için oluşumun tamamlanmaya yakın olduğu saptanmıştır (**Şekil 45-46-47**). Carmustine grubunda ise interselüler aralıklar kontrol gruplarına göre geniş saptanmıştır. Purkinje, büyük ve küçük nöronların yanısıra balonlaşmış hücrelerde gözlemlenmiştir. Geniş interselüler aralıklar sebebiyle kan- beyin bariyeri için imaj tamamlanmamıştır. Yer yer RGH'ler

saptanmıştır. RGH'ler ve nöronlar arasında gap- junctionlar izlenmektedir. Buradaki nöron nükleuslarının büyük çoğunluğunun heterokromatik yapıda olduğu saptanmış ve kontrol gruplarına kıyasla ökromatik nükleuslu hücreye ender rastlanmıştır. Aksonal filopodlar ve glial uzantılar diğer gruplara göre daha az sayıda ve genellikle ayrık oluşuyla sinaptogenezisin başlangıç aşamasında olduğu görülmüştür. Özellikle aksosomatik sinaps görüntüsü belirgin değildir (**Şekil 48**). Carmustine+ Melatonin grubunda ise kontrol gruplarına göre aralıklar daha geniş, ancak aksonal filopodia, aksosomatik sinapslar deney gruplarına göre daha belirgindir. Glial hücre uzantıları aktin içeriklerinin fazla olması nedeniyle aksonal dendritik uzantıların arasında yer almaktadır. Ancak, Purkinje hücrelerine ait nükleuslar ökromatiktir. Nükleusları belirgin olmasına rağmen nükleolemmal invaginasyon, perinüklear bölgede yoğunluğun az olmasıyla melatonin etkisinin deney grubundaki dramatik histogenezis ve retardasyonu engellediği ultrastrüktürel olarak görülmüştür (**Şekil 49**).

Bu araştırmada, üzerinde oldukça az elektron mikroskopik çalışma yapılmış olan yeni doğan cerebellumu ultrastrüktürel olarak da incelenmiştir [223]. Carmustine grubunun, kontrol grupları ve Carmustine+ Melatonin grubuna göre embriyogenezisin daha gerisinde olduğu gözlemlenmiştir. Carmustine+ Melatonin grubu ise sinaptogenezis bakımından kontrollerden daha geride olup Carmustine grubuna göre daha gelişmiş olarak saptanmıştır.

Tüm histopatolojik ve embriyolojik bulgular Tablo 3'de özetlenmiştir (Bakınız sayfa 124).

Moleküler oksijenin metabolizmanın temeli olarak kullanılması aerobik organizmalar için hem faydalı hem de zararlıdır. O₂ oksidatif fosforilasyon yoluyla verimli bir mitokondriyal enerji üretimi sağlarken, yan ürünleri de

hücrelerin optimal işleyişine zararlıdır. Bu nedenle O_2 majör bir çevre kirletici olarak kabul edilebilir. Başka moleküller ile çok kolay elektron alışverişine girerek yapılarını bozan moleküllere “serbest radikaller”, “oksidan moleküller” veya “reaktif oksijen partikülleri” adı verilmektedir [116, 134]. Serbest radikaller ve reaktif türler olarak da bilinen O_2 yan ürünleri hücrelerdeki gerekli makromoleküllere zarar vererek onların fizyolojik etkinliğini azaltır. Bu ajanlarla devamlı yıkım sonucunda, organellerin canlılığı azalır ve hücreler apoptozis veya nekroz yoluyla yok edilirler.

Enzimler, toksik reaktanların subselüler kompartmanlarının temizlenmesinde önemli rol oynarlar. Bu gruptaki antioksidanlar arasında SOD, katalaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz ve glukoz- 6- fosfat dehidrogenaz bulunur. Moleküllerin oksidatif hasarı sonucunda ortaya çıkan serbest oksijen radikalleri nörodejeneratif bozukluklar, diabetes mellitus, kalp damar hastalıkları ve farklı kanser tiplerini içeren birçok hastalığın patogeneğinde rol oynamaktadır.

Oksijen radikallerinin hasara yol açtığı moleküller arasında proteinler, nörotransmitterler, nükleik asitler ve yağ asitleri bulunmaktadır [92]. Artmış oksijen radikallerinin, hastalığın patogeneğinden ve daha sonra gözlenen komplikasyonlarından lipid peroksidasyonu aracılığı ile sorumlu olduğu ileri sürülmüştür [23].

Oksijen kaynaklı serbest radikaller, hücre hasarı ve hücre ölümü için önemli mediyatörlerdir. Yaşlanma prosesinde rol oynayan birçok reaktif kimyasal bileşik, doğrudan veya dolaylı olarak ateroskleroz, reperfüzyon hasarı ve kanser gibi daha birçok hastalığı içeren süreçlerde yer almaktadır [53]. Poliansatüre yağ asidlerinin oksidatif yıkılımı olarak tarif edilen ve zincirleme gerçekleşen bir dizi tepkimenin

yer aldığı lipid peroksidasyonunu demir ve bakır gibi iz metaller, ultraviole veya radyasyon katalizleyebilir.

MDA, peroksidasyona uğramış poliansatüre yağ asidlerinden oluşan reaktif bileşiklerden biridir. Üç karbonlu malondialdehid bir ketoaldehiddir [183]. Birçok makromolekül ile hızlı bir şekilde tepkimeye giren ve çok reaktif bir bileşik olan MDA, serbest olarak veya farklı doku bileşenleri ile kompleks oluşturmaktadır. Doku lipid peroksidasyonu sonucu oluşan MDA, hücresel düzeyde metabolize edilir. Biyolojik örneklerde lipid peroksidasyonunun ve serbest radikal aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan en kolay ve yaygın yöntem, MDA'nın TBA ile tepkimesidir [97].

Süperoksid anyon radikallerine karşı ana savunma aracı olan SOD, süperoksidin hidrojen perokside dönüşümünü katalizleyen bir metalloenzimdir [44]. Hücre içi SOD aktivitesindeki artış dioksijenin toksisitesine karşı gelişen bir direnç artışına neden olur [183]. SOD, $O_2^{\cdot-}$ 'nin H_2O_2 'ye yıkımını katalize ederek hücreyi oksidatif hasara karşı korur. Omurgalılarda manganez- içeren (MnSOD) ve bakır/çinko içeren (CuZnSOD) SOD en baskın izoformlardır. SOD'ın oksidatif hasarın azaltılmasındaki biyolojik ilişkisi çeşitli deneysel durumlarda gösterilmiştir [44].

MDA ölçümleri, Carmustine grubunda en yüksek değerde iken Melatonin-Kontrol grubunda en düşük bulunmuştur. Gruplar arası istatistiksel değerlendirilme yapıp Carmustine grubuyla kıyaslandığında anlamlı sonuç elde edilmiştir. SOD ölçümlerinde ise en yüksek değer kontrol gruplarında saptanmış olup en düşük değer ise Carmustine grubunda görülmüştür. Fakat, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç bulunmamıştır. Carmustine grubunda MDA düzeyleri yüksek bulunurken, SOD düzeylerinde bir miktar düşüş

bulunsa da anlamlı bir farklılığın görülmemesi, Carmustine kullanımından kaynaklanan oksidatif stresin SOD düzeylerinde poliansatüre lipidleri, lipid peroksidasyonundan koruyabilecek yeterli kompanzasyonu gösteremediğini düşündürmektedir (**Tablo 4**). Carmustine+ Melatonin grubunda ise melatonin, SOD düzeylerinde belirgin bir artışa neden olmasa da SOD düzeyleri Carmustine grubuna göre daha yüksek bulunmuştur. Carmustine uygulamasına melatonin tedavisinin eklenmesiyle lipid peroksidasyon ürünü olan MDA düzeylerinin düşük kalması, melatoninin doymamış yağ asidlerinin oksidasyonunu bir miktar kısıtlamış olduğunu düşündürmektedir (**Şekil 50**). SOD enzimiyle kompanzasyon işleminin daha açık izlenebilmesi için SOD aktivitesi yanısıra SOD ekspresyonlarının da incelenmesi ileri çalışmalarla daha net anlaşılabacaktır.

Biyokimyasal bulgular eşliğinde gruplar arasında yüksek MDA seviyesine sahip Carmustine grubunda apoptotik hücrelerin de yüksek olması dikkat çekicidir. Hücre membranının aminofosfolipid organizasyonunu bozan MDA'nın hücre hasarında ve yaşlanma belirtisi olan lipofuksin pigmentinin oluşumuna etkisi bilinmektedir. MDA'nın mutajenik olduğu ve kimyasal karsinojen gibi davrandığı da gösterilmiştir. Yüksek MDA'nın hem apoptozisi tetiklemesi, hem de apoptozis hızını yükselttiği sonucuna varılmıştır.

6. BÖLÜM V

6.1. SONUÇ

1. Yeni doğan (P0) cerebellumunun korteks laminar yapısı geç embriyonal döneme uygunluk gösterir ve bu da yetişkinlerden tamamen farklıdır.
2. Kontrol ve serum fizyolojik uygulanan gruba kıyasla melatonin uygulanan kontrol grubunda deneysel melatonin dozunun nörogenezis üzerinde ayrımlanabilen bir etki yapmadığı sonucuna varılmıştır.
3. E15.gün uygulanan antineoplastik ajan Carmustine embriyonal gelişime zararlı olup termi postmatur yönde değiştirmekte, cerebellar displaziye neden olmakta ve nörogenezisi olumsuz etkilemektedir. E15.gün Carmustine uygulanan deney grubuna, uygulamayı takiben her gün belirli dozda melatonin enjeksiyonu displazinin geriye dönüşümünde saptanabilen bir pozitif etki göstermiştir.
4. Yenidoğan döneminde normal sayılan nöronal apoptozis artışı Carmustine uygulanan deney grubunda diğer gruplarla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır. Bu, Carmustine'nin DNA alkilleyici özelliğine bağlanmıştır.
5. Carmustine grubunda görülen yüksek apoptotik hücre sayısı ve TGF- β 1 immunoreaktivitesinin dağınık ve az oluşu; apoptotik süreçte tetikleyici etki yapabileceğini düşündürmektedir.
6. RGH, kontrol gruplarında deney grubuna kıyasla daha yoğundur, tedavi grubunda ise kontrolden az deney grubundan fazla olarak saptanmıştır. Bunun nedeni olarak da melatonin'in nöroprotektif özelliğine ve deney gruplarının migrasyonda geri kalmalarına bağlanmıştır.

7. Yüksek MDA seviyesine sahip Carmustine grubunda apoptotik hücre sayısının da fazla olması dikkat çekicidir. Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan yüksek MDA'nın apoptozisin tetiklemesinde bir neden olabileceği düşünülmüştür.
8. Makroskopik olarak Kontrol, SF ve Melatonin- Kontrol gruplarına ait yeni doğan cerebellumları Carmustine ve Carmustine+ Melatonin grubuna göre daha büyük görülmüştür. Bu da yüksek apoptozis hızına bağlanmıştır.
9. Hamilelik döneminde Carmustine kullanımı, olgularda hamileliğin sonlandırma kriterlerinden birisi olmalıdır.
10. Hamile olguların radyolojik ve klinik bakılarının daha dikkatli yapılması ve fizyolojik zararı olmayan, aksine birçok çalışma ile yararlı etkileri gösterilen melatoninin hamilelik periyodunda uygun dozda kullanılabilirliği ile ilgili daha ileri çalışmalar ve klinik deneyler gerekmektedir.

7. BÖLÜM VI

7.1. ÖZET (ABSTRACT)

7.1.1. ÖZET

Kortikal displazi, kortikal gelişim dönemlerine bağlı olarak oluşan gelişimsel hatalardan meydana gelen malformasyondur. Bu çalışmada gebelik döneminde Carmustine'e maruz kalınması sonucu oluşan kortikal displazinin yenidoğan cerebellumundaki histopatolojik etkisini gözlemek, nöroprotektif bir ajan olan melatoninin koruyucu olarak kullanılabilirliğini araştırmak ve konu hakkında literatüre katkıda bulunmak hedeflenmiştir.

Çalışmada kullanılan Wistar albino dişi sıçanlar (200- 220 gr) uygun şartlarda intakt kontrol, sham, ekzojen melatonin tedavisi uygulanan, Carmustine uygulanan, Carmustine ve melatonin tedavisi uygulanan olmak üzere beş deney grubuna ayrılmıştır. Yenidoğan sıçan cerebellumları ışık mikroskopik, immunohistokimyasal, elektron mikroskopik ve biyokimyasal olarak MDA ve SOD düzeyleri ölçülerek değerlendirilmiştir.

Kontrol, Sham ve Melatonin- Kontrol gruplarına ait deneklerin yenidoğanlarında, yenidoğan cerebellumuna özgü histogenezisin migrasyon ve maturasyonunun devamını gösteren bulgular saptanmıştır. Kortikal displazik yeni doğan sıçan cerebellumunda ise daha erken embriyonal dönem cerebellar kortekse ait yapısal görünüm saptanmıştır. Ayrıca, Carmustine grubunda saptanan ultrastrüktürel bulgular ve immunohistokimyasal olarak artmış apoptotik hücre sayısı ve Nestin (+) hücre sayısı ile azalmış GFAP (+), Synaptophysin (+), TGF- β 1 (+) immunreaksiyonu, maturasyonda gecikme olduğu sonucunu ortaya koymuş ve bu sonuç biyokimyasal bulgularla desteklenmiştir. Melatoninin hamilelik periyodunda uygun dozda kullanılabilirliği ile ilgili daha ileri çalışmalar ve klinik deneyler gerekmektedir.

Anahtar sözcükler: kortikal displazi, gebelik, yeni doğan, sıçan, cerebellum

7.1.2. ABSTRACT

Cortical dysplasia is a cortical malformation resulting from any developmental defects during different periods of development. This study aims to contribute to the scientific literature by investigating the cerebellar histopathological alterations in the neonates with cortical dysplasia due to the prenatal exposure to carmustine and the possible effects of prophylaxis with melatonin, a neuroprotective agent.

Wistar albino female rats (200-220 g) were randomly divided into five experimental groups; intact-control, sham-operated, exogenous melatonin-treated, carmustine-treated and Carmustine+Melatonin-treated. Light microscopy, immunohistochemistry, electron microscopy were carried out on the newborn cerebellum and MDA and SOD levels were determined biochemically.

Histopathology of cerebellum from the control, sham-operated and melatonin-treated groups showed continuity of migration and maturation which is a pathognomonic sign of the newborn cerebellum. However, cerebellar cortex from the newborns of cortical dysplasia group showed the histology of early embryonic cerebellar cortex. Furthermore, the ultrastructural studies and immunohistochemically the increased apoptotic cell numbers and Nestin (+) cell numbers and the decreased positive immunoreactivity to GFAP, synaptophysin and TGF- β 1 in the carmustine-treated group were showed a significant delay in the maturation which was supported by biochemical findings.

It has been concluded that careful medical examination must be done under the view of medical abortion indication to the women who need an alkylating agent; treatment during their pregnancy. Additional clinical trials are required to evaluate melatonin administration during pregnancy at suitable doses.

Keywords: cortical dysplasia, pregnancy, newborn, rat, cerebellum

8. BÖLÜM VII

8.1. KAYNAKLAR

1. Abou-Donia M.B., Khan W.A., Dechkovskaia A.M., et all. (2006). In utero exposure to nicotine and chlorpyrifos alone, and in combination produces persistent sensorimotor deficits and Purkinje neuron loss in the cerebellum of adult offspring rats. *Arch Toxicol., Sep;80 (9):620-31*.
2. Acuna-Castroviejo D., Escames G., Macias M., et all.(1995). Cell protective role of melatonin in the brain, *J Pineal Res. 19: 57-63*.
3. Alberts B. (2002). *Molecular Biology of the Cell*. New York: Garland Publishing Co. Fourth Edition, 680-697.
4. Alder J., Cho N.K., Hatten M.E. (1996). Embryonic precursor cells from the rhombic lip are specified to a cerebellar granule neuron identity. *Neuron., Sep;17(3):389-99*.
5. Allendoerfer K.L, Shatz C. J. (1994). The subplate, a transient neocortical structure: its role in the development of connections between thalamus and cortex, *Annu Rev Neurosci., 17: 185-218*.
6. Altman J., Bayer S.A.(1990). Migration and distribution of two populations of hippocampal granule cell precursors during the perinatal and postnatal periods. *J Comp Neurol., 301(3):365-81*.
7. Altman J., Bayer SA.(1985a). Embryonic development of the rat cerebellum. I. Delineation of the cerebellar primordium and early cell movements. *J Comp Neurol., 231:1–26*.
8. Altman J., Bayer S.A.(1985b). Embryonic development of the rat cerebellum. II. Translocation and regional distribution of the deep neurons. *J. Comp. Neurol., 231: 27–41*.

9. Ameisen J.S.(1996). The origin of programmed cell death. *Science.*, 272(5266):1278-9.
10. Andreasen N.C., O’Leary D.S., Cizadlo T., et all. (1996). Schizophrenia and cognitive dysmetria: a positron-emission tomography study of dysfunctional prefrontal-thalamic-cerebellar circuitry. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 93:9985–9990.
11. Arima M., Ono K., Hisada K. and Handa T. (1971). A familial syndrome of maldevelopment of the brain, polycystic kidneys, congenital tapeto-retinal dysplasia with coloboma and unilateral ptoisis. *No To Hattatsu.*,3:330–331.
12. Balakumran A., Champbell G.A, Maslen M.T.(1996). Calcium channel blockers induce thymic apoptosis in vivo in rats. *Toxicol Appl Pharmacol.*, 139: 122-127.
13. Barkovich A.J., Kuzniecky R.I., Jackson G.D., et all.(2005). A developmental and genetic classification for malformations of cortical development. *Neurology.*, 27;65(12):1873-87.
14. Barkovich A.J. (2000). Pediatric neuroimaging, Lippincott William& Wilkins III. Edition Chapter 5, 253-381.
15. Barkovich A.J, Peck W.W.(1997). MR of Zellweger syndrome *AJNR Am J Neuroradio.*, 18(6):1163-70.
16. Barkovich A.J., Kjos B.O., Norman D. and Edwards M.S. (1989). Revised classification of posterior fossa cysts and cyst-like malformations based on results of multiplanar MR imaging. *Am J Neuroradiol.*, 10:977–988.
17. Barlow-Walden L.R., Reiter R.J., Abe M. (1995). Melatonin stimulates brain glutathione peroxidase activity. *Neurochem Int.*, 26: 497–502.

18. Bayer, S.A, Altman, J., Russo, R.J. and Zhang, X., (1993). Timetables of neurogenesis in the human brain based on experimentally determined patterns in the rat. *Neurotoxicology.*, 14 83–144.
19. Bellamy C.O., Malcomson R.D., Harrison D.J and Wyllie A.H (1995). Cell death in health and disease: the biology and regulation of apoptosis. *Cancer Biology.*, 6: 3-16
20. Berger-Sweeney J., Hohmann C.(1997). Behavioral consequences of abnormal cortical development: insights into developmental disabilities. *Behav Brain Res.*, 86: 121-142.
21. Berman K.F., Illowsky B.P., Weinberger D.R.(1988). Physiological dysfunction of dorsolateral prefrontal cortex in schizophrenia, IV: further evidence for regional and behavioral specificity. *Arch Gen Psychiatry.*, 45:616–62.
22. Benardete E.A, Kriegstein A.R. (2002). Increased excitability and decreased sensitivity to GABA in an animal model of dysplastic cortex. *Epilepsia.*,43(9):970-82.
23. Bianchi G., Solaroli E., Zaccheroni V., et al. (1999). Oxidative stress and anti-oxidant metabolites in patients with hyperthyroidism: effect of treatment. *Horm Metab Res.*, 31; 620-624.
24. Blask D.E., Sauer L.A., Dauchy RT. (2002). Melatonin as a chronobiotic/anticancer agent. *Curr Top Med Chem.*, 2, 113–132.
25. Bloom F.E. (1993). Advancing a neurodevelopmental origin for schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry.*, 50:224–227

26. Boche D., Cunningham C., Docagne F., et al. (2006). TGF β 1 regulates the inflammatory response during chronic neurodegeneration. *Neurobiol Dis.*, 22(3):638-50.
27. Boltshauser E., Herdon M., Dumermuth G. and Isler W. (1981). Joubert syndrome: clinical and polygraphic observations in a further case. *Neuropediatrics.*, 12(2):181-91.
28. Borghesani P.R., Peyrin J.M., Klein R., et al. (2002). BDNF stimulates migration of cerebellar granule cells. *Development.*, 129(6):1435-42.
29. Bossy J. (1990). Anatomie clinique Neuroanatomy. I Edition. S:229-238
30. Bottner M., Krieglstein K., Unsicker K. (2000). The transforming growth factor-betas: structure, signaling, and roles in nervous system development and functions, *J Neurochem.*, 75(6):2227-40
31. Bökesoy T.A., Çakıcı İ., Melli M. (2000), Farmakoloji Ders Kitabı, Ankara, Gazi Kitabevi.
32. Bragg T.W., St George E.J., Wynne-Jones G.A., et al. (2005). Familial Dandy-Walker syndrome: a case report supporting an autosomal inheritance. *Childs Nerv Syst.*, Nov 1:1-3
33. Brionne T.C., Tesseur I., Masliah E. and Wyss-Coray T. (2003). Loss of TGF-beta 1 leads to increased neuronal cell death and microgliosis in mouse brain. *Neuron.*, 40(6):1133-45.
34. Burke J.R, Wingfield M.S, Lewis K.E, et al. (1994). The Haw River syndrome: dentatorubropallidoluysianatrophy in an African-American family. *Nat Genet.*, 7:521-524.
35. Calabro F., Arcuri T., Jinkins J.R. (2000). Blake's pouch cyst: an entity within the Dandy-Walker continuum. *Neuroradiology.*, 42:290–295.

36. Cardinali D.P. (2003). Clinical perspectives for the use of melatonin as a neuroprotective chronobiotic in Alzheimer's disease. *Aktual Neurol.*, 3:, 188–204
37. Cardinali D.P., Borfman G.P., Liotta G., et al. (2002). A multifactorial approach employing melatonin to accelerate resynchronization of sleep-wake cycle after a 12 timezone westerly transmeridian flight in elite soccer athletes. *J Pineal Res.*, 32: 41–46
38. Carlson B.M (1996). Development of The Nervous System. Patten's Foundations of Embryology, 427-477.
39. Caviness V.S.J., Takahashi, T., Nowakowski R. S. (1995). Numbers, time and neocortical neuronogenesis: a general developmental and evolutionary model. *Trends Neurosci.*, Sep;18(9):379-83.
40. Caviness V.S.J. (1982). Neocortical histogenesis in normal and reeler mice: a developmental study based upon [3H] thymidine autoradiography. *Dev Brain Res.*, 4:293–302.
41. Caviness V.S.J, Rakic P. (1978). Mechanisms of cortical development: a view from mutations in mice. *Annu. Rev. Neurosci.*, 1:297–326
42. Caviness V.S, Sidman R. (1973). Time of origin and corresponding cell classes in the cerebral cortex of normal and reeler mutant mice: an autoradiographic analysis. *J. Comp Neurol.*, 148:141–52
43. Champe P.C, Harvey R.A (1994). Lippincot's illustrated reviews: Biochemistry second edition, J B Lippincot Company, Philadelphia.
44. Chan P.H. (1996). Role of oxidants in ischemic brain damage. *Stroke.*, 27(6):1121-1128.

45. Cohen J.J. (1993). Apoptosis: The physiological pathway of cell death. *Hosp Pract.*, 15: 35-43.
46. Choi I.S., Cho J.H., Kim J.H., et al. (2004). Excitability of CA1 neurons in the model of malformation-associated epilepsy. *Neuroreport.*, Jul 19;15 (10):1639-42.
47. Constam D.B., Schmid P., Aguzzi A., et al. (1994). Transient production of TGF-beta 2 by postnatal cerebellar neurons and its effect on neuroblast proliferation. *Eur J Neurosci.*, 6(5):766-78.
48. Cooper G., Geoffrey M. (2000) The Cell: A Molecular Approach. 2nd edition, Sinauer Associates Inc. Sunderland MA., 440-446
49. Cummings M.C., Winterford C.M., Walker N.I. (1997). Apoptosis. *Am J Surg Pathol.*, 21: 88-101.
50. Dahlstrand J., Lardelli M., Lendahl U. (1995). Nestin mRNA expression correlates with the central nervous system progenitor cell state in many, but not all, regions of developing central nervous system. *Brain Res Dev Brain Res.*, 84(1):109-29
51. Davis C.A, Joyner A.L. (1988). Expression patterns of the homeoboxcontaining genes En-1 and En-2 and the proto-oncogene Int-1 diverge during mouse development. *Genes Dev.*, 2:1736–1744.
52. De Sampaio e Spohr T.C, Martinez R, Da Silva E.F, et al. (2002). Neuroglia interaction effects on GFAP gene: a novel role for transforming growth factor-beta1. *Eur J Neurosci.*, Dec;16(11):2059-69.
53. De Zwart L.L., Meerman H.N.J., Commandeur J.N.M and Vermeulen N. P. E. (1999) Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and humans. *Free Radic Biol Med.*, 26(1-2):202-26.

54. Demaerel P, Wilms G, Marchal G. (1999). Rostral vermian cortical dysplasia: MRI. *Neuroradiology.*, 41:190–19.
55. Deukmedjian A.J, King M.A, Cuda C. and Roper S.N. (2004). The GABAergic system of the developing neocortex has a reduced capacity to recover from in utero injury in experimental cortical dysplasia. *J Neuropathol Exp Neurol.*, 63(12):1265-73.
56. Di W.F., Bian W., Kong L., et al. (2001). Maternal zinc deficiency impairs brain nestin expression in prenatal and postnatal mice. *Jnh Cell Research.*, 11(2), 135-141.
57. Dobbertin A., Schmid P., Gelman M., et al. (1997). Neurons promote macrophage proliferation by producing transforming growth factor-beta2. *J Neurosci.*, 17(14):5305-15.
58. Dobyns W.B., Andermann E., Andermann F. et al. (1996). X-linked malformations of neuronal migration. *Neurology.*, 47(2):331-9.
59. Doetsch F, Caille I, Lim D.A, et al. (1999). Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell.*, 11;97(6):703-16
60. Dreyfus C.F. (1998). Neurotransmitters and neurotrophins collaborate to influence brain development. *Perspect Dev Neurobiol.*, 5(4):389-99.
61. Drews U. (2000), Renkli Embriyoloji Atlası, Çeviren; Aytekin, Y., Gürsoy, E., Nobel Tıp Kitapevi, İstanbul , 232-234
62. Dvorak K., Feit J., Jurankova Z. (1978). Experimentally induced focal microgyria and status verrucosus deformis in rats: pathogenesis and interrelation: histological and autoradiographical study. *Acta Neuropathol Berl.*, 44: 121–129.

63. El-Deiry W.S, Tokino T, Velsulesko V.E, et al. (1993). WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*, 75(4):817-25.
64. Esscher E., Flodmark O., Hagberg Gi, Hagberg B. (1996). Nonprogressive ataxia: origins, brain pathology, and impairments in 78 Swedish children. *Dev Med Child Neurol.*, 38:285–296
65. Fawcett D.W, Jenesh R.P. (1977). Pineal gland in concise histology. ed: Bloom M, Fawcett D.W, Chapman & Hall International Thomson Publ., New York, p: 164-165.
66. Fink A.J., Englund C., Daza R.A., et al. (2006). Development of the deep cerebellar nuclei: transcription factors and cell migration from the rhombic lip. *J Neurosci.*, 15;26(11):3066-76.
67. Flanders K.C., Winokur T.S., Holder M.G. and Sporn M.B. (1993). Hyperthermia induces expression of transforming growth factor-beta s in rat cardiac cells in vitro and in vivo. *J Clin Invest.*, 92(1): 404-410.
68. Focke, P.J, Schiltz C.P., Jones S.E., et al. (2001). Enteric Neuroblasts require the Phosphatidylinositol 3-Kinase Pathway for GDNF stimulated Proliferation. *J Neurobiol.*, 47 306–317.
69. Froes M.M., Correia A.H., Garcia-Abreu J., Spray D.C. and Campos de Carvalho A.C. (1999). Gap-junctional coupling between neurons and astrocytes in primary central nervous system cultures. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 96(13):7541-6
70. Ganong W. (1995). Tıbbi Fizyoloji, 19.Baskı Çeviren: Doğan A., İstanbul, Barış Kitapevi, 230-235.

71. Gao J.H., Parsons L.M., Bower J.M., et al. (1996). Cerebellum implicated in sensory acquisition and discrimination rather than motor control. *Science.*, 272:545–547.
72. Gao W.Q., Hatten E. (1994). Immortalizing oncogenes subvert the establishment of granule cell identity in developing cerebellum. *Development.*, 120:1059-1070
73. Garcia C.M., Darland D.C., Massingham L.J. et al. (2004). Endothelial cell-astrocyte interactions and TGF beta are required for induction of blood-neural barrier properties. *Brain Res Dev Brain Res.*, 152(1):25-38
74. Garcia-Abreu J., Cavalcante L.A., Moura Neto V. (1995). Differential patterns of laminin expression in lateral and medial midbrain glia. *Neuroreport.*, 6(5):761-4
75. García-Verdugo J.M., Doetsch F., Wichterle H., et al.(1998). Architecture and cell types of the adult subventricular zone (SVZ): in search of the stem cells. *J Neurobiol.*, 36: 234-248
76. Gartner L.P., Hiatt J.L. (2001). Color Textbook of Histology, W.B Saunders Company; USA, II.Edition.,183-217.
77. Gelbard H.A., Boustany R-M, Schor N.F. (1997). Apoptosis in development and disease of the central nervous system. *Pediatric Neurol.*, 16(2):93-97.
78. Gierdalski M., Juliano S.L. (2003). Factors affecting the morphology of radial glia. *Cereb Cortex.*, 13(6):572-9.
79. Gilad E., Cuzzocrea S., Zingarelli B., et al. (1997). Melatonin is a scavenger of peroxynitrite. *Life Sci.*, 60:169–74.

80. Gitto E., Reiter R.J., Amodio A., et al. (2004). Early indicators of chronic lung disease in preterm infants with respiratory distress syndrome and their inhibition by melatonin. *J Pineal Res.*, 36, 250–255.
81. Gitto E., Reiter R.J., Karbownik M., et al. (2002). Causes of oxidative stress in the pre and perinatal period. *Biol Neonate.*, 81, 146–157
82. Gitto E., Karbownik M., Reiter R.J., et al. (2001). Effects of melatonin treatment in septic newborns. *Pediatr Res.*, 50; 756–760.
83. Goldberg T.E., Gold J.M., Greenberg R., et al. (1993). Contrasts between patients with affective disorders and patients with schizophrenia on a neuropsychological test battery. *Am J Psychiatry.*, 150: 1355–1362.
84. Goldowitz D., Hamre K. (1998). The cells and molecules that make a cerebellum. *Trends Neurosci.*, 21:375–382
85. Gomes F.C., Sousa Vde O., Romao L. (2005). Emerging roles for TGF-beta1 in nervous system development. *Int J Dev Neurosci.*, 23(5):413-24.
86. Gomes F.C., Paulin D., Moura Neto V. (1999). Glial fibrillary acidic protein (GFAP): modulation by growth factors and its implication in astrocyte differentiation. *Braz J Med Biol Res.*, 32(5):619-31
87. Grant J., Radkowski M.A., De Leon G., et al. (1998). Seven-month-old child with rapidly increasing head circumference. *Pediatr Neurosurg.*, 28:154–159.
88. Greenough W.T., Chang, F. L. (1988). Plasticity of synapse structure and pattern in the cerebral cortex. In *Cerebral Cortex*, , Plenum, New York, 391–440.
89. Grishkat H., Eisenman L. (1995). Development of the spinocerebellar projections in the prenatal mouse. *J Comp Neurol.*, 363:93–108.

90. Gurwitz D., Cunningham D.D.(1988). Thrombin modulates and reverses neuroblastoma neurite outgrowth. *Proc Natl Acad SciUSA*,85(10):3440-4.
91. Hagemann G., Kluska M.M, Redecker C., et al. (2003). Distribution of glutamate receptor subunits in experimentally induced cortical malformations. *Neuroscience*, 117; (4) :991-1002
92. Haliwell B. (1993). The role of oxygen radicals in human disease with particular reference to the vascular system. *Haemotasis*, 23(1): 118-126.
93. Haliwell B. (1991). Reactive oxygen species in living system: Source, biochemistry and role in human disease. *Am J Med*, 91: 145-225.
94. Hasling T.A., Gierdalski M., Jablonska B. and Juliano S.L. (2003). A radialization factor in normal cortical plate restores disorganized radial glia and disrupted migration in a model of cortical dysplasia. *Eur J Neurosci*, 17(3):467-80.
95. Hatten M.E. (1999). Central nervous system neuronal migration. *Annu Rev Neurosci*, 22,511-39
96. Hockfield S., McKay R.D.G, (1985). Identification of Major Cell Classes in the Developing Mammalian Nervous System. *J. Neuroscience*, 5:3310-3328.
97. Holley A.E., Cheeseman K.H. (1993). Measuring free radical reactions in vivo. *Brit Med Bull*, 49(3):494-505
98. Jacobs K.M., Kharazia V.N., Prince D.A. (1999). Mechanisms underlying epileptogenesis in cortical malformations. *Epilepsy Res*, 36(2-3):165-88.
99. Jacobson M. (1991). Histogenesis and morphogenesis of cortical structures, in *Developmental Neurobiology*. New York, Plenum, 401–451.

- 100.** Joubert M., Eisenring J.J., Robb J.P. et al. (1969). Familial agenesis of the cerebellar vermis: a syndrome of episodic hyperpnea, abnormal eye movements, ataxia, and retardation. *Neurology.*, 19:813–825.
- 101.** Joyner AL. (1996). Engrailed, Wnt and Pax genes regulate midbrain, hindbrain development. *Trends Genet.*, 12:15–20.
- 102.** Junqueira, L.C., Carneiro, J., Kelley R.O. (2006). Temel Histoloji. 10. Baskı. Çeviri Editörü; Yener Aytekin; 161-190.
- 103.** Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessell T.M.(2000). Principles of Neural Science. 4.Edition, The McGraw-Hill companies, USA, 67-88; 323-324; 910-935.
- 104.** Karam S., Burrows R., Logan C., et al (2000). Eph receptors and ephrins in the developing chick cerebellum: relationship to sagittal patterning and granule cell migration. *J Neurosci.*, 20:6488–6500.
- 105.** Kayaalp, S.O. (2000). Tıbbi Farmakoloji, 9.Baskı, Ankara, Hacettepetaş yayınları, 36.konu, 384-389.
- 106.** Kerr J.F.R, Wyllie A.H, Currie A.R.(1972). Apoptosis. A basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.*, 26: 239-245.
- 107.** Kiess W, Gallaher B (1998). Hormonal control of programmed cell death apoptosis. *Eur J Endocrin.*, 18: 482-491.
- 108.** Kierszenbaum A.L, Histology and Cell Biology, Mosby inc., 2002. 199-225
- 109.** Kim S.G., Ugurbil K., Strick P.L.(1994). Activation of a cerebellar output nucleus during cognitive processing. *Science.*, 265:949–951.

- 110.** Kolb B., Sutherland R.J. (1992). Noradrenaline depletion blocks behavioral sparing and alters cortical morphogenesis after neonatal frontal cortex damage in rats. *J. Neurosci.*, (12) 2321– 2330
- 111.** Komuro H., Yacubova E., Yacubova E. and Rakic P. (2001). Mode and tempo of tangential cell migration in the cerebellar external granular layer. *J Neurosci.*, 21:527–540.
- 112.** Kondo S., Najm I., Kunieda T., et al.(2001). Electroencephalographic characterization of an adult rat model of radiation-induced cortical dysplasia. *Epilepsia.*, 42(10):1221-7.
- 113.** Köktürk İ. (1967). Elektron mikroskop ve genel araştırma metotları, İzmir, Bornova Ege Üniversitesi Matbaası, 53-54, 68-69,108-113, 115-116.
- 114.** Kriegstein K., Suter-Crazzolaro C., Fischer W.H and Unsicker K. (1995). TGF-beta superfamily members promote survival of midbrain dopaminergic neurons and protect them against MPP+ toxicity. *EMBO J.*, 14:736–742
- 115.** Kuhn H.G., Dickinson-Anson H., Gage F.H. (1996). Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci.*, 16(6):2027-33.
- 116.** Kurata M., Suzuki M., Agar N.S. (1993). Antioxidant systems and erythrocyte lifespan in mammals. *Comp Biochem Physiol B.*, 106(3):477-487.
- 117.** Kvetnoy I.M. (1999). Extrapineal melatonin: Location and role within diffuse neuroendocrine system, *Histochem J.*, 31:1-12.

118. Kuzniecky R, Murro A, King D, et al. (1993). Magnetic resonance imaging in childhood intractable partial epilepsies: pathologic correlations. *Neurology*, 43(4):681-7.
119. Lane S.C., Jolly R.D., Schmechel D.E., et al. (1996). Apoptosis as the mechanism of neurodegeneration in Batten disease. *J. Neurochem.*, 67:677-683.
120. Lee P., Shiu S.Y., Chow P.H. (1995). Regional and diurnal studies of melatonin and melatonin binding sites in the duct gastrointestinal tract, *Biol Signals.*, 4: 212.
121. Lendahl V., Zimmerman L.B., McKay R.D.G. (1990). CNS Stem Cells Express A New Class of intermediate filament protein. *Cell.*, 60:585-595.
122. Lim D., Alvarez-Buylla A. (1999). Interaction between astrocytes and adult subventricular zone precursors stimulates neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 96, ,7526-7531.
123. Lin J.C., Cai L., Cepko C.L. (2001). The external granule layer of the developing chick cerebellum generates granule cells and cells of the isthmus and rostral hindbrain. *J Neurosci.*, 21:159–168
124. Lin J.C., Cepko C.L. (1998). Granule cell raphes and parasagittal domains of Purkinje cells: complementary patterns in the developing chick cerebellum. *J Neurosci.*, 18:9342–9353.
125. Lissoni P., Rovelli F., Malugani F, et al. (2001). Anti-angiogenic activity of melatonin in advanced cancer patients. *Neuroendocrinol Lett.*, 22,45–47
126. Loken A.C., Hanssen O., Halvorsen S., et al. (1998). Hereditary renal dysplasia and blindness. *Acta Paediatr.*, 1961;50:177–184.

127. Lu J., Ashwell K., Ken W.S. and Waite P. (2000). Advances in spinal cord injury: Role of Apoptosis. *Spine.*, 25: 1859-1866.
128. Luhmann H.J., Raabe K.(1996). Characterization of neuronal migration disorders in neocortical structures: I.Expression of epileptiform activity in an animal model, *Epilepsy Research.*, 26, 67-74.
129. Majno G., Torisl A.(1995): Apoptosis oncosis and necrosis. *Am J Pathol.*, 146: 3-15.
130. Martinez G., Carnazzaa M.L, Di Giacomob C., et al. (2001). Expression of bone morphogenetic protein-6 and transforming growth factor- β 1 in the rat brain after a mild and reversible ischemic damage. *Brain Research.*, 894;(1)1-11.
131. Massague J. (2000). How cells read TGF-beta signals. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 1(3):169-78
132. Matsuda M., Katoh-Semba R., Kitani H. and Tomooka Y. (1996). A Possible Role of The Nestin protein in the developing central nervous system in rat embryos, *Brain Res.*,723(1-2):177-89.
133. McKeon R.J., Juryne M.J., Buck C.R.(1999).The chondroitin sulfate proteoglycans neurocan and phosphacan are expressed by reactive astrocytes in the chronic CNS glial scar. *J Neurosci.*, 19:10778–10788
134. Mc Kord J.M. (1985). Oxygen derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med.*, 213(3): 159-163.
135. McMahon A., Joyner A., Bradley A. and McMahon J. (1992). The midbrainhindbrain phenotype of Wnt-1-/Wnt-1-mice results from stepwise deletion of engrailed-expressing cells by 9.5 days postcoitum. *Cell.*, 69:581–595.

136. Merrill J.E., Zimmerman R.P. (1991). Natural and induced cytotoxicity of oligodendrocytes by microglia inhibitable by TGF- β . *Glia*, 4:327-331
137. Meyer-Puttlitz B., Junker E., Margolis R.U., and Margolis R.K. (1996). Chondroitin sulfate proteoglycans in the developing central nervous system. II. Immunocytochemical localization of neurocan and phosphacan. *J Comp Neurol*, 366:44-54
138. Millen K., Wurst W., Herrup K. and Joyner A. (1994). Abnormal embryonic cerebellar development and patterning of postnatal foliation in two mouse Engrailed-2 mutants. *Development*, 120:695-706.
139. Mittleman P., Labourdette G., Zingg H. and Guenot-Di Scala D. (2002) Neurons modulate oxytocin receptor expression in rat cultured astrocytes: involvement of TGF-beta and membrane components. *Glia*, 37(2):169-77.
140. Mokry J., Nemecek S. (1998). Immunohistochemical Detection of Intermediate Filament Nestin. *Acta Medica (Hradec Kralove)*, 41(2):73-80.
141. Monyer H., Burnashev N., Laurie D.J., et al. (1994). Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron*, 12(3):529-40
142. Moore C.A. (1987). The Development of Mossy Fibres and Climbing Fibres: Embryonic and Postnatal Features. New York: Alan R Liss, 57-88
143. Moore K.L, Persuid T.V.N. (2002). Klinik Yönleriyle İnsan Embriyolojisi, Çeviri Editörleri; Yıldırım, M., Okar, İ., Dalçık, H., 6.Baskıdan Çeviri, İstanbul, Nobel Tıp Kitapevi, 453-487.
144. Morimoto K., Watanabe T., Ninomiya T., et al. (2004). Quantitative evaluation of central-type benzodiazepine receptors with iomazenil in

- experimental epileptogenesis:II. The rat cortical dysplasia model. *Epilepsy Res.*, 61(1-3):113-8.
145. Nadarajah B, Parnavelas JG. (2002). Modes of neuronal migration in the developing cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci.*, 3(6):423-32.
 146. Nakano R.(1997).Apoptosis: Gene directed cell death. *Horm Res.*, 48:2-4.
 147. Nat R., Voiculescu B., Stanciu C., et al. (2001). Apoptosis in human embryo development: Cerebellum. *J Cell Mol Med.*,5(2):179-87
 148. Necchi D., Scherini E. (2002). The malformation of the cerebellar fissura prima: a tool for studying histogenetic processes. *Cerebellum.*, 1(2):137-42.
 149. Norman M.G., McGillivray, B.C, Kaousek D.K, et al.(1995). In congenital malformation of the brain: Pathologic, Embryological, Clinical, Radiological and Genetic Aspect, Oxford Univ. Pres, Newyork (ed. Norman , M, G.) 223-277.
 150. Nowak Y.Z., Zawilsha Y.B. (1998). Melatonin and its physiological and therapeutic properties, *Pharm World Sci.*, 20: 18- 27.
 151. Noyan, A.. Fizyoloji Ders Kitabı, (1988). 5.Baskı, Meteksan Basımevi, Ankara, 329-338 .
 152. Okano H. (2002). Stem Cell Biology of the Central Nervous System. *J Neurosci Res.*, 69:698–707.
 153. Patel S., Barkovich A. J (2002). Analysis and Classification of Cerebellar Malformations. *Am J Neuroradiol.*, 23:1074–1087.
 154. Paxinos G., Mai J.K., The Human Nervous System (2004), Elsevier Academic Press San Diego, USA, Chapter 10-11; 267-320; 321-382

155. Pehlemann F.W., Sievers J., Berry M. (1985). Meningeal cells are involved in foliation, lamination, and neurogenesis of the cerebellum: evidence from 6-hydroxydopamine-induced destruction of meningeal cells. *Dev Biol.*, 110(1):136-46.
156. Pfrieder F.W, Barres B.A. (1997). Synaptic efficacy enhanced by glial cells in vitro. *Science.*, 277 (5332):1684-7.
157. Pieri C., Marra M., Moroni F., et al. (1995). Melatonin: a peroxy radical scavenger more effective than vitamin E. *Life Sci.*, 55: 271–276.
158. Poeggeler B., Saarela S., Reiter R.J., et al. (1994). Melatonin a highly potent endogenous radical scavenger and electron donor: new aspects of the oxidation chemistry of this indole assessed in vitro. *Ann NY Acad Sci.*, 738:419–20.
159. Pratt B.M., McPherson J.M. (1997). TGF-beta in the central nervous system: potential roles in ischemic injury and neurodegenerative diseases. *Cytokine Growth Factor Rev. Dec*;8 (4):267-92.
160. Prehn J.H., Bindokas V.P, Jordan J., et al. (1996). Protective effect of transforming growth factor-beta 1 on beta-amyloid neurotoxicity in rat hippocampal neurons. *Mol. Pharmacol.*, 49:319–328
161. Prehn J.H., Bindokas V.P, Marcuccilli C., et al. (1994). Regulation of neuronal BCL2 protein expression and calcium homeostasis by transforming growth factor type beta confers wide-ranging protection on rat hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91:12599-12603.
162. Prehn, J.H., Kriegstein J.(1994). Opposing effects of transforming growth factor-beta 1 on glutamate neurotoxicity. *Neuroscience*. 60:7–10

163. Prehn, J.H., Peruche B., Unsicker K., and Krieglstein J. (1993). Isoform-specific effects of transforming growth factors-beta on degeneration of primary neuronal cultures induced by cytotoxic hypoxia or glutamate. *J. Neurochem.*, 60:1665–1672
164. Price D. J., Aslam S., Tasker L., and Gillies K. (1997). Fates of the earliest generated cells in the developing murine neocortex. *J Comp Neurol.*, 377, 414.
165. Raimondi A.J., Sato K., Shimoji T. (1984). The Dandy-walker syndrome. Basel: Karger Press,1-75.
166. Rakic P. (1990). Principles of neural cell migration. *Experientia.*, 46 : 882–891.
167. Rakic, P. (1972). Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. *J Comp Neurol.*, 145, 61-84.
168. Rakic P. (1971). Neuron-glia relationship during granule cell migration in developing cerebellar cortex. *J Comp Neurol.*, 141, 283-312.
169. Rakic P., Sidman R.L. (1970). Histogenesis of cortical layers in human cerebellum, particularly the lamina densa. *J Comp Neurol*;139:473–500.
170. Ramaekers V.T., Heimann G., Reul J., et al. (1997). Genetic disorders and cerebellar structural abnormalities in childhood. *Brain.*, 120:1739–1751.
171. Raybaud C. (1982). Cystic malformations of the posterior fossa: abnormalities associated with development of the roof of the fourth ventricle and adjacent meningeal structures. *J Neuroradiol.*, 9:103–133.

172. Reiter R.J, Tan D.X, Osuna C. et al. (2000). Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress: a review. *J Biomed Sci.*, 7:444–458.
173. Reiter R.J., Guerrero J.M., Garcia J.J. et al. (1998). Reactive oxygen intermediates, molecular damage, and aging: relation to melatonin. *Ann NY Acad Sci*; 854:410–424.
174. Reiter R.J. (1998). Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin. *Prog Neurobiol.*, 56, 359–384.
175. Reiter R.J., Melchiorri D., Sewerynek E. (1995). A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *J Pineal Res.*, 18:1–11.
176. Reiter R.J. (1995). The pineal gland and melatonin relation to aging: a summary of the theories and of the data. *Exp Gerontol.*, 30: 199-212.
177. Reiter R.J, Trakulrungsi W.K., Trakulrungsi C., et al.(1982). Pineal melatonin production: endocrine and age effects. Melatonin rhythm system. Int. Symp, (Basel, Karger). Bethesda, Md, 143-154
178. Renfranz P.J., Cunningham M.G., McKay R.D. (1991). Region-specific differentiation of the hippocampal stem cell line HiB5 upon implantation into the developing mammalian brain. *Cell.*,66(4):713-29.
179. Rickert C.H.(2006). Cortical dysplasia: neuropathological aspects. *Childs Nerv Syst.*,22(8):821-6.
180. Rodriguez C., Mayo J.C., Sainz R.J. (2004). Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J Pineal Res.*, 36, 1–9.
181. Roper S.N. (1998). In utero irradiation of rats as a model of human cerebrocortical dysgenesis: a review. *Epilepsy Res.*,32(1-2):63-74.

182. Ross M., Romrell L.J. (1995). Histology A Text and Atlas, USA, Williams &Wilkins, 256-284.
183. Rumley A.G., Paterson J.R. (1998). Analytical aspects of antioxidants and free radical activity in clinical biochemistry. *Ann Clin Biochem.*, 35:181-200.
184. Ruocco A., Nicole O., Docagne F, et al. (1999). A transforming growth factor-beta antagonist unmasks the neuroprotective role of this endogenous cytokine in excitotoxic and ischemic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab.*, 19:1345–1353
185. Sadler T.W. (1996). Langman’s Medikal Embriyolojisi; Çeviren, Başaklar, A., 7.Baskı, Ankara, Özkan matbaası, 358-396.
186. Saito S., Matoba R., Ueno N.(2002). Comparison of gene expression profiling during postnatal development of mouse dentate gyrus and cerebellum. *Physiol Genomics.*, 8(2):131-7
187. Salinas P., Fletcher C., Copeland N. (1994). Maintenance of Wnt-3 expression in Purkinje cells of the mouse cerebellum depends on interactions with granule cells. *Development.*, 120:1277–1286.
188. Satran D., Pierpont M.E, Dobyns W.B. (1999). Cerebello-Oculo-Renal syndromes including Arima, Senior-Loöken and COACH syndromes: more than just variants of Joubert syndrome. *Am J Med Genet.*, 86:459–469.
189. Schmechel D., Rakic P. (1979a). Arrested proliferation of radial glial cells during midgestation in rhesus monkey. *Nature.*, 227:303–5.

- 190.** Schmechel D., Rakic P. (1979b). A Golgi study of radial glial cells in developing monkey telencephalon: morphogenesis and transformation into astrocytes. *Anat Embryol.*, 156:115;52.
- 191.** Schwartzman R.A., Cidloski J.A.(1993). Apoptosis; the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocr Rev.*, 14: 133-144.
- 192.** Segal J.L., Gonzales .E, Yousefi S., et al. (1997). Circulating levels of IL-2R, ICAM-I, and IL-6 in spinal cord injuries. *Arch Phys Med Rehabil.*, 78: 44-47.
- 193.** Senior B., Friedmann A.I., Braudi J.L. (1961). Juvenile familial nephropathy with tapetoretinal degeneration. *Am J Ophthalmol*;52: 625–633.
- 194.** Sentman M.L., Brannström T., Westerlund S., et al. (2001). Extracellular superoxide dismutase deficiency and atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*,21:1477-1482.
- 195.** Sheehan D.C., Hrapchak B.B. (1980). Theory and practice of Histotechnology, USA.
- 196.** Sidman R.L., Rakic P. (1982). Development of the human central nervous system, in Haymaker W, Adams RD (eds): Histology and Histopathology of the Nervous System. Springfield, IL, Charles C. Thomas Publisher, 73-76, 94–110.
- 197.** Sievers J., Pehlemann F.W., Baumgarten H.G. and Berry M.(1985). Selective destruction of meningeal cells by 6-hydroxydopamine: a tool to study meningeal-neuroepithelial interaction in brain development. *Dev Biol.*, 110 (1):127-35.

- 198.** Simonati A., Rosso T., Rizzuto N., (1997). DNA fragmentation in normal development of the human central nervous system: A morphological study during corticogenesis. *Neuropathol Appl Neurobiol.*, 23, 203.
- 199.** Sirotkin A.V., Schaeffer H.J. (1997). Direct regulation of mammalian reproductive organs by serotonin and melatonin. *J Endocrinol*, 154: 1-5.
- 200.** Smyth M.D., Barbaro N.M., Baraban S.C. (2002). Effects of antiepileptic drugs on induced epileptiform activity in a rat model of dysplasia. *Epilepsy Res.*, 50(3):251-64.
- 201.** Spencer S., Cataldo N.A., Jaffe R.B. (1996). Apoptosis in the human female reproductive tract. *Obstet Gynecol Surv.*, 5:314-323.
- 202.** Spornitz U. M., Socin C.D., Dravid A.A. (1999), Estrous stage determination in rats by means of scanning electron microscopic images of uterine surface epithelium. *Anat Rec.*, 254, 116-126.
- 203.** Spornitz U.M., Rinderknecht B P., Edelmann A. and Scheidegger B. (1994). Ultrastructure as a basis for dating of rat endometrium. *Anat Rec.*, 238, 163-176.
- 204.** Snell R.S. (2000). Klinik Nöroanatomi. Çeviren; Mehmet Yıldırım., 4.Baskı, İstanbul, Sökmen matbaası, 203-206.
- 205.** Sozmen E.Y., Sozmen B., Girgin F. (2001). Antioxidant enzymes and paraoxonase show a co-activity in preserving low density lipoprotein from oxidation. *Clin Exp Med.*, 1:195-199
- 206.** Steinlin M., Blaser S., Boltshauser E. (1998). Cerebellar involvement in metabolic disorders: a pattern-recognition approach. *Neuroradiology.*, 40:347-354.

207. Stevens A., Lowe J.S. (1992). Histology. Gower Medical Publishing, London, 206-223.
208. Suhonen J.O., Peterson D.A., Ray J. and Gage FH.(1996). Differentiation of adult hippocampus-derived progenitors into olfactory neurons in vivo. *Nature.*, 383(6601):624-7.
209. Şeftalioğlu A. (1988). İnsan Embriyolojisi, Ankara, Feryal Matbaası, 518-538.
210. Takanashi J., Sugita K., Barkovich A.J., et al (1999). Partial midline fusion of the cerebellar hemispheres with vertical folia: a new cerebellar malformation ?. *AJNR Am J Neuroradiol.*, 20: 1151–1153.
211. Tan D.X., Reiter R.J., Manchester L.C., et al. (2002). Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger. *Curr Top Med Chem.*, 2; 181–198
212. Tan D.X., Chen L.D., Poeggeler B. (1993). Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocr J.*, 1:57–60.
213. Taylor M.A. (1991).The role of the cerebellum in the pathogenesis of schizophrenia. *Neuropsychiatry Neuropsychol Behav Neurol*; 4:251–280.
214. Tekelioğlu M. (1998). Genel Tıp Histolojisi, 3.Baskı, İstanbul, Beta Basımevi, 173,209
215. Teksam M., Ozyer U., McKinney A., et al. (2005). Fetal MRI of a severe Dandy-Walker malformation with an enlarged posterior fossa cyst causing severe hydrocephalus. *Fetal Diagn Ther.* , 20(6):524-7.
216. Thompson C.B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science.*, 267: 1456-1462.

- 217.** Tortori-Donati P., Fondelli M., Rossi A and Carini S. (1996). Cystic malformations of the posterior cranial fossa originating from a defect of the posterior membranous area: mega cisterna magna and persisting Blake's pouch: two separate entities. *Childs Nerv Syst.*, 12:303–308.
- 218.** Tschulun N., Wenzel J.H., Katleba K. and Schwartzkroin P.A.(2005). Initiation and spread of epileptiform discharges in the methylazoxymethanol acetate rat model of cortical dysplasia: functional and structural connectivity between CA1 heterotopia and hippocampus/neocortex. *Neuroscience.*, 133 (1):327-42.
- 219.** Turgut M, Uyanikgil Y, Ates U, et al. (2006). Pinealectomy stimulates and exogenous melatonin inhibits harmful effects of epileptiform activity during pregnancy in the hippocampus of newborn rats: an immunohistochemical study. *Childs Nerv Syst.*, 22(5):481-488.
- 220.** Umeoka S.I, Miyamoto O., Nakagawa T.J, et al. (2001). Expression of an embryonic intermediate filament protein in amygdaloid kindled rats. *Epilepsy Research*, 43, 249-253.
- 221.** Unsicker K., Strelau J. (2000). Functions of transforming growth factor-beta isoforms in the nervous system. Cues based on localization and experimental in vitro and in vivo evidence. *Eur J Biochem.*, 267(24):6972-5.
- 222.** Uyanikgil Y., Turgut M., Baka M., et al. (2005). Beneficial effects of melatonin on morphological changes in postnatal cerebellar tissue owing to epileptiform activity during pregnancy in rats: light and immunohistochemical study. *Brain Res Dev Brain Res.*, 159(2):79-86.

223. Uyanıkgil Y., Baka M., Yurtseven M. and Turgut M. (2004). The effect of experimental epilepsy induced by penicillin administration during pregnancy on nestin expression in the immature rat cerebellum: A light, electron microscopic, and immunohistochemical study, *Childs Nerv Syst.*, 20:176–182
224. Uylings C.G., Van Eden C.G., Parnaveles J.G. and Kaalskeek A. (1991) The prenatal and postnatal development of rat cerebral cortex. In B. Kolb and R.C. Tees, *The Cerebral Cortex of the Rat*, MIT Press, Cambridge, MA, 35–75.
225. Uchida K. (2000). Role of reactive aldehyde in cardiovascular disease. *Free Radical Biol Med.*, 28(12):1685-1696.
226. Van Leeuwen F.W., Buijs R.M., Pool C.W. (1990). *Molecular Neuroanatomy*, Amsterdam, Elsevier Science Publishers.
227. Vermeulen N.P., Baldew G.S.(1992). The role of lipid peroxidation in the nephrotoxicity of cisplatin. *Biochem Pharmacol*, 44:1193–1199.
228. Vicario-Abejon C., Cunningham M.G., McKay R.D. (1995). Cerebellar precursors transplanted to the neonatal dentate gyrus express features characteristic of hippocampal neurons. *J Neurosci.*, Oct;15(10):6351-63.
229. Vivien D., Bernaudin M., Buisson A., et al. (1998). Evidence of type I and type II transforming growth factor-beta receptors in central nervous tissues: changes induced by focal cerebral ischemia. *J Neurochem.*, 70(6):2296- 304)
230. Volkow N.D., Levy A., Brodie J.D., et al .(1992). Low cerebellar metabolism in medicated patients with chronic schizophrenia. *Am J Psychiatry.*, 149:686–688

231. Voogd J., Glickstein M. (1998). The anatomy of the cerebellum. *Trends Neurosci.*, 21:370–375.
232. Wang F.D., Bian W., Kong L.W., et al. (2001). Maternal zinc deficiency impairs brain nestin expression in prenatal and postnatal mice. *Journal of Cell Research.*, 11(2), 135-141.
233. Wassef M., Joyner A. (1997). Early mesencephalon/metencephalon patterning and development of the cerebellum. *Perspect Dev Neurobiol.*, 5:3–16.
234. Whittemore S.R., Morassutti D.J., Walters W.M, et al. (1999). Mitogen and substrate differentially affect the lineage restriction of adult rat subventricular zone neural precursor cell populations. *Exp Cell Res.*, 252, 75-95.
235. Wolff J.R., Laskawi R., Spatz W.B. and Missler M., (1995) Structural dynamics of synapses and synaptic components. *Behav.Brain Res.*, 66 13–20.
236. Wolin M.S., Gupte S.A., Oeckler R.A. (2002). Superoxide in the vascular system. *J Vascular Res.*, 9: 191-207.
237. Wong M., Wells PG. (1989). Modulation of embryonic glutathione reductase and phenytoin teratogenicity by 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea (BCNU). *J Pharmacol Exp Ther.*, 250(1):336-42
238. Wurst W., Auerbach A., Joyner A. (1994). Multiple developmental defects in Engrailed-1 mutant mice: An early mid-hindbrain deletion and patterning of defects in forelimbs and sternum. *Development.*, 120: 2065– 2075.

239. Yachnis, A.T., Rorke L.B (1999). Cerebellar and Brainstem Development: An Overview in Relation to Joubert Syndrome. *J Child Neurol.*, 14: 570-573.
240. Zhang R. L., Zhang Z.G., Zhang L. and Chopp M.(2001). Proliferation and differentiation of progenitor cells in the cortex and the subventricular zone in the adult rat after focal cerebral ischemia. *Neuroscience.*, 105, 33-41.
241. <http://www.usm.maine.edu/psy/broida/101/neuron.JPG>
242. <http://csn.beckman.uiuc.edu/cerebellum.gif>
243. <http://anatomy.yonsei.ac.kr/neuro/Cbll2K1.files/frame.html>
244. www.utdallas.edu/~tres/integ/mot4/display4_15.html
245. <http://content.answers.com/main/content/wp/en/thumb/0/0d/250px-EmbryonicBrain.png>
246. <http://www.uth.tmc.edu/scriptorium/gallery/kelly/pics/kelly2.gif>
247. <http://dev.biologists.org/content/vol129/issue19/images/small/DEV1836F9.gif>
248. <http://www-micro.msb.le.ac.uk/3035/kalmakoff/baculo/pics/Apoptosis.gif>

9. ÖZGEÇMİŞ

01. 02. 1976 tarihinde İzmir’de dünyaya geldi. İlk, orta ve lise eğitimini İzmir’de tamamladı. 1995– 1999 yılları arasında Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Temel ve Endüstriyel ağırlıklı Mikrobiyoloji AD’dan mezun oldu.

1999 yılında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD’da yüksek lisans öğrencisi oldu. 2000 yılında Araştırma Görevlisi kadrosuna atandı. 2002 yılında yüksek lisans programını “Gebelik Döneminde Epileptik Nöbet Geçiren Sıçanların Yenidoğan Cerebellumlarının Işık ve Elektronmikroskopik Olarak İncelenmesi” isimli tez çalışmasını yaparak tamamladı.

2003 yılında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD doktora sınavını kazanarak doktora eğitimine başladı. 2004 yılında tekrar araştırma görevlisi kadrosuna atandı. Halen bu göreve devam etmektedir.

Lisansüstü eğitimi boyunca SCI’de taranan dergilerde yayınlanan 9, başka indekslerde taranan 2 yurtdışı olmak üzere toplam 11 yurt dışı yayını, çeşitli hakemli dergilerde yayınlanan 12 yurt içi yayını bulunmaktadır. Uluslararası kongrelerde 1, yurtiçi kongre ve toplantılarda 4 sözlü sunusu bulunurken, Uluslararası kongrelerde 5 poster, Ulusal kongrelerde 13 poster sunusu bulunmaktadır. Lisansüstü eğitimi boyunca 10 kongre ve 17 bilimsel kurs etkinliğinde bulunmuştur. Türk Histoloji&Embriyoloji ve Türk Toksikoloji Derneği üyesidir. Ayrıca, 3 tane araştırma projesinde görev almıştır.

Sinirbilim, immunohistokimya, elektron mikroskopi, kök hücre, flow sitometri konularına ilgi duymakta olup, yabancı dili İngilizce’dir.